

Lilian Castiglioni Ruiz

Estudo do Padrão de Esterases em Quatro Populações  
de *Haematobia Irritans* (Mosca-do-Chifre)



LILIAN CASTIGLIONI RUIZ

**ESTUDO DO PADRÃO DE ESTERASES EM QUATRO POPULAÇÕES  
DE *Haematobia irritans* (MOSCA-DO-CHIFRE)**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em 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-UNESP.

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

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos



701/96

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

1995





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

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron**



Dedico este trabalho:

Aos meus queridos pais, Edna e Duílio, que com todo seu amor, carinho e dedicação constante, muito trabalharam para minha formação pessoal e profissional.

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

Ao meu querido esposo Antônio Carlos que, com muito amor e compreensão, vivenciou cada momento desta investigação, sempre incentivando-me.



Dedico este trabalho:

Aos meus queridos pais, **Edna e Duilio**, que com todo seu amor, carinho e dedicação constante, muito trabalharam para minha formação pessoal e profissional.

Ao meu querido esposo **Antonio Carlos** que, com muito amor e compreensão, vivenciou cada momento desta investigação, sempre incentivando-me.

que, com muito empenho, participou da minha formação científica.



## AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, expressei minha sincera gratidão às pessoas que, durante o desenvolvimento do mesmo, estiveram presentes e contribuíram de diferentes formas para sua realização.

Agradeço em especial à minha orientadora, Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela confiança em mim depositada, pelo seu entusiasmo, dedicação e incentivo, sempre presente durante o desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela preciosa amizade e brilhante orientação.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, por ter colocado seu laboratório à minha disposição, por sua dedicação e constante participação na elaboração da parte experimental deste trabalho, pela convivência agradável e preciosa amizade, e, também, sua valiosa co-orientação.

Ao Prof. Antônio José Manzato, pela prontidão com que se dispôs a auxiliar na análise estatística.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, do Departamento de Botânica, pela disponibilidade na leitura do Summary.

Aos Professores Doutores João Stenghel Morgante e José Osmar Gaspar, pelas valiosas sugestões e criteriosa análise da pré-forma desta dissertação.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Wladimir João Tadei, pela colaboração incansável no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sebastião Pereira Martins, do Departamento de Ciências de Computação e Estatística, pela colaboração na impressão dos gráficos.

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, orientadora e amiga, exemplo de perseverança, dedicação ao trabalho e amor à Ciência que, com muito empenho, participou da minha formação científica.

Aos Professores do Departamento de Biologia, pelos valiosos ensinamentos, pela convivência amiga e estímulos ao meu ingresso na vida acadêmica. Em especial, à Profa. Dra. Marlene K. H. Kobayashi e ao Prof. Sebastião Roberto Taboga.

As Professoras Doutoras Mary Regina e Sônia Nanya, pelo carinho, amizade e com as quais muito aprendi.

Ao Prof. Dr. Laerte Mello, do Departamento de Química e Geociências, exemplo de dedicação e postura científica que muito me incentivou, e com o qual tive a oportunidade de realizar o meu primeiro estágio na graduação.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, pelo fornecimento dos recursos materiais.



## AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, expresso minha sincera gratidão às pessoas que, durante o desenvolvimento do mesmo, estiveram presentes e contribuíram de diferentes formas para sua realização.

Agradeço em especial à minha orientadora, Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela confiança em mim depositada, pelo seu entusiasmo, dedicação e incentivo, sempre presente durante o desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela preciosa amizade e brilhante orientação.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, por ter colocado seu laboratório à minha disposição, por sua dedicação e constante participação na elaboração da parte experimental deste trabalho, pela convivência agradável e preciosa amizade, e, também, sua valiosa co-orientação.

Ao Prof. Antônio José Manzato, pela prontidão com que se dispôs a auxiliar na análise estatística.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, do Departamento de Botânica, pela disponibilidade na leitura do Summary.

Aos Professores Doutores João Stenghel Morgante e José Osmar Gaspar, pelas valiosas sugestões e criteriosa análise da pró-forma desta dissertação.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Wladimir João Tadei, pela colaboração inestimável no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sebastião Pereira Martins, do Departamento de Ciências de Computação e Estatística, pela colaboração na impressão dos gráficos.

À Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de A. Oliveira, pela valiosa contribuição na coleta das moscas, exemplo de dedicação e entusiasmo à pesquisa, e afetuosa amiga, presente em todos os momentos.

À Profa. Dra. Lillian Madi-Ravazzi, pelo carinho, amizade e incentivo constante, durante o curso de Graduação e no meu ingresso na Pós-Graduação.

Aos Professores do Departamento de Biologia, pelos valiosos ensinamentos, pela convivência amiga e estímulos ao meu ingresso na vida acadêmica. Em especial, à Profa. Dra. Marlene K. H. Kobayashi e ao Prof. Sebastião Roberto Taboga.

Às Professoras Doutoradas Mary Itoyama e Satiko Nanya, pelo carinho, amizade e com as quais muito aprendi.

Ao Prof. Dr. Laerte Miola, do Departamento de Química e Geociências, exemplo de dedicação e postura científica que muito me incentivou, e com o qual tive a oportunidade de realizar o meu primeiro estágio na graduação.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, pelo fornecimento dos recursos materiais.



Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial às secretárias Olga B. Pelicer, Simone C. Fernandes e ao técnico Josué Rodrigues dos Santos, pela competência e presteza na realização de suas tarefas.

Aos funcionários do Departamento de Química e Geociências, em especial ao João Rodrigues dos Santos e ao Jorge Freytag Buchid, pelo auxílio técnico laboratorial.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial à Nanci Queiroz de A. Pereira e à Onilda Naves de O. Akasaki, pela eficiência e disposição na realização de suas funções.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial à Olinda Vacari T. Luchezi e à Maria do Carmo Junqueira, pela prontidão, simpatia e valioso auxílio dispensado no levantamento bibliográfico e na revisão das referências bibliográficas.

Às secretárias do Departamento de Ciências de Computação e Estatística, Sandra de F. Amaro Silistino e Olga Maria R. Ferreira, pela presteza e disposição na impressão dos gráficos.

À Soraia Fernandes Rodrigues, pela competência e capricho na elaboração dos desenhos, e pelos serviços de xerox.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Mestrado.

À todos os colegas do Curso de Pós-Graduação, pela convivência amiga, solicitude e incentivo constante.

Agradeço, em especial, às minhas queridas amigas e colegas de trabalho no laboratório, pela amizade, gostosa convivência e estímulos constantes: Alba Regina de A. Lima Catelani, que muito ajudou na formatação deste texto, Ana Silvia Lapenta, que me auxiliou no aprendizado da técnica de eletroforese e Fádua R. Coelho-Rits, com quem também pude aprender muito sobre a técnica de eletroforese e gentilmente forneceu as amostra de moscas proveniente de Paranaíba.

Às colegas de Pós-Graduação Mara Garcia Tavares, Ana Maria A. de Oliveira e Priscila Belentani, Érika C. Pavarino, Andréa Borduchi e Sheila A. Vayego, pela amizade, companherismo e incentivo constante.

Aos meus queridos amigos Renato, Ana Paula e Maria José, pelo amor, carinho, dedicação e amizade sincera, sempre presentes em minha vida, proporcionando-me momentos de muita alegria.

Aos meus amados Andréa e Fernando, pelo companherismo, carinho, dedicação e exemplo de amizade verdadeira, com os quais eu pude dividir todos os momentos da minha vida e muito aprender.

Aos meus amados Flora e Antonio Ruiz Garcia, Paulo Roberto e Sandra, que me receberam na família com todo seu amor e carinho, sempre compreendendo os momentos em que estive ausente, e incentivando-me a prosseguir.

Aos meus sobrinhos, que tanto amo, Fernando, Camilo e Daniel, motivo de muita alegria e de momentos inesquecíveis.

Aos meus amados pais, Edna e Duilio, por todo seu amor, carinho, exemplo de dedicação e sacrifício, sem os quais eu não poderia ter chegado até aqui, minha eterna gratidão.

À minha irmã Luciane, a quem tanto amo, por todo seu carinho, dedicação, amor, exemplo de coragem e perseverança, companheira de todas as horas, minha eterna gratidão.

Ao meu amado esposo Antonio Carlos, pelo seu amor, compreensão e incentivo imprescindíveis, minha eterna gratidão.

Enfim, à todos, o meu muito obrigado, e...

...a Deus, pelo dom da vida.

Tempo para matar, e tempo para sarar;

Tempo para demolir, e tempo para construir;

Tempo para chorar, e tempo para sorrir;

Tempo para gerar, e tempo para dançar;

Tempo para atirar pedras, e tempo para ajuntá-las;

Tempo para dar abraços, e tempo para apartar-se;

Tempo para procurar, e tempo para perder;

Tempo para guardar, e tempo para jogar fora;

Tempo para calar, e tempo para falar;

Tempo para odiar, e tempo para amar;

Tempo para a guerra, e tempo para a paz.

Todas as coisas que Deus fez são boas, a seu tempo. Assim, conclui que nada é melhor para o homem do que alegrar-se e procurar o bem-estar durante sua vida, e que, gozar do fruto de seu trabalho é um dom de Deus."

Eclesiastes 3: 1-8, 11-13



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

**Tempo para nascer, e tempo para morrer;**

**Tempo para plantar, e tempo para colher o que foi plantado;**

**Tempo para matar, e tempo para sarar;**

**Tempo para demolir, e tempo para construir;**

**Tempo para chorar, e tempo para sorrir;**

**Tempo para gemer, e tempo para dançar;**

**Tempo para atirar pedras, e tempo para ajuntá-las;**

**Tempo para dar abraços, e tempo para apartar-se;**

**Tempo para procurar, e tempo para perder;**

**Tempo para guardar, e tempo para jogar fora;**

**Tempo para calar, e tempo para falar;**

**Tempo para odiar, e tempo para amar;**

**Tempo para a guerra, e tempo para a paz.**

**Todas as coisas que Deus fez são boas, a seu tempo. Assim, conclui que nada é melhor para o homem do que alegrar-se e procurar o bem-estar durante sua vida, e que, gozar do fruto de seu trabalho é um dom de Deus."**

**Eclesiastes 3: 1-8, 11-13**



# ÍNDICE

|        |                                                                                              |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.     | INTRODUÇÃO.....                                                                              | 1  |
| I.1.   | Problemas causados pela mosca-do-chifre.....                                                 | 1  |
| I.2.   | Aspectos biológicos da mosca-do-chifre.....                                                  | 3  |
| I.3.   | Métodos utilizados para controle da mosca-do-chifre.....                                     | 3  |
|        | A. Principais técnicas e compostos químicos empregados.....                                  | 3  |
|        | B. Controle biológico e compostos alternativos.....                                          | 6  |
| I.4.   | Aspectos relacionados com a aquisição de resistência aos inseticidas.....                    | 9  |
| I.5.   | Classificação e função das enzimas esterásicas.....                                          | 12 |
| I.6.   | Origem das enzimas esterásicas.....                                                          | 22 |
| I.7.   | Objetivos.....                                                                               | 26 |
| II.    | MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                     | 27 |
| II.1.  | Obtenção das amostras.....                                                                   | 27 |
| II.2.  | Preparo dos géis.....                                                                        | 30 |
| II.3.  | Preparo das amostras para a realização da eletroforese.....                                  | 31 |
| II.4.  | Identificação das esterases.....                                                             | 31 |
| II.5.  | Secagem dos géis.....                                                                        | 32 |
| II.6.  | Testes com inibidores.....                                                                   | 32 |
|        | A. Malathion.....                                                                            | 33 |
|        | B. Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF).....                                               | 33 |
|        | C. Sulfato de cobre.....                                                                     | 33 |
|        | D. Triton X-100.....                                                                         | 34 |
|        | E. Ácido iodoacético.....                                                                    | 34 |
|        | F. Fluoreto de sódio.....                                                                    | 34 |
|        | G. Sulfato de eserina.....                                                                   | 34 |
|        | H. Beta-mercaptoetanol.....                                                                  | 34 |
|        | I. p-Cloromercuribenzoato (pCMB).....                                                        | 35 |
| II.7.  | Análise estatística.....                                                                     | 35 |
| III.   | RESULTADOS.....                                                                              | 36 |
| III.1. | O padrão de bandas esterásicas e sua variação nas populações analisadas.....                 | 36 |
| III.2. | Efeitos de alguns inibidores sobre as bandas esterásicas de <i>Haematobia irritans</i> ..... | 69 |
| IV.    | DISCUSSÃO.....                                                                               | 76 |
| VI.    | RESUMO E CONCLUSÕES.....                                                                     | 88 |
| VII.   | SUMMARY AND CONCLUSIONS.....                                                                 | 90 |
| VIII.  | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                              | 92 |



## I. INTRODUÇÃO

### I.1. Problemas econômicos causados pela mosca-do-chifre

*Haematobia irritans* (L.), popularmente conhecida como a mosca-do-chifre, é um díptero, da família Muscidae. Fêmeas e machos na fase adulta são hematófagos obrigatórios, parasitas do gado e como tal, causadores de sérias preocupações.

Os problemas causados pela mosca-do-chifre são inúmeros. Sua picada dolorida causa inquietação no gado e lesões cutâneas, predispondo-os a infecções bacterianas. As moscas adultas permanecem dia e noite em seu hospedeiro. Segundo Kunz *et al.* (1970), usualmente, as fêmeas só deixam esse hospedeiro para ovopositar. A fêmea alimenta-se em média 36 vezes por dia e o macho 12 vezes. Em uma infestação com aproximadamente 500 moscas por animal, que pode ser considerada baixa, podemos estimar uma perda de 7 ml de sangue por dia, por animal. Esta perda não seria suficiente para causar sérios prejuízos econômicos (Harris *et al.*, 1974; Harvey & Launchbaugh, 1982). Contudo, a inquietação e irritação do gado, causadas pelas picadas da mosca-do-chifre e por sua presença, podem reduzir seu tempo de pastagem e conseqüentemente o gado se alimentará menos, podendo interferir no processo normal de digestão e assimilação dos nutrientes e diminuir suas horas de repouso, causando estresse. Este último, por sua vez, faz com que o animal perca peso, reduza sua capacidade reprodutiva, comprometendo a produção de carne e leite, o que pode causar grandes prejuízos à pecuária bovina leiteira e de corte, isto sem levarmos em conta o aumento da suscetibilidade do animal a doenças secundárias (Harvey & Brethour, 1979, Harvey & Launchbaugh, 1982).

A produtividade do animal depende de uma complexa relação entre a sua raça e a disponibilidade de água e alimento em um ambiente adequado, e ainda, da sua saúde (Byford *et al.*, 1992). A saúde do animal é um fator que afeta a eficiência com que o gado converte a forragem (pastagem) em proteína animal para consumo humano. Um fator de grande importância que pode interferir na saúde do rebanho é o ataque de ectoparasitas e as doenças que eles podem transmitir. Segundo Byford *et al.* (1992) existem aproximadamente 50 espécies de ectoparasitas de importância veterinária que podem infestar o gado. Destes, cerca de 10 espécies são de moscas. Das espécies de



moscas ectoparasitas, a que tem causado maiores prejuízos nos rebanhos dos Estados Unidos e também de inúmeros países da América Central e do Sul (inclusive o Brasil), é a mosca-do-chifre. Nos Estados Unidos a mosca-do-chifre lidera a lista de ectoparasitas, causando uma perda para a pecuária de cerca de US\$730 milhões por ano (Drummond *et al.*, 1981; Drummond, 1987).

Os prejuízos causados pela presença da mosca-do-chifre no gado tornaram essa mosca objeto de estudos de muitos autores. Em 1946, Laake estimou um número médio de moscas por animal, que poderia variar de acordo com a idade do mesmo. Em vacas jovens, foram observadas até cerca de 3.000 moscas por animal, enquanto que em vacas mais velhas e touros esse número médio chegou a 20.000. Estudos mais recentes relataram uma grande redução nesses números. Campbell & Thomas (1992) atribuem esta diminuição, não ao resultado de modificações climáticas drásticas ou de modificações na biologia da mosca, mas sim ao grande número de técnicas utilizadas no controle desse organismo.

Alguns estudos realizados para determinar os efeitos da infestação da mosca-do-chifre no desenvolvimento do gado têm produzido resultados diferentes. Essig & Pund (1965) relataram que infestações por mosca-do-chifre não exercem influência no ganho de peso dos bezerros como consequência da diminuição na produção de leite pelas vacas infestadas. Haufe (1982) e Schreiber *et al.* (1987) verificaram que o ganho de peso do gado não é afetado em infestações de até 230 moscas por animal. Em contraste, Campbell (1976) verificou em seus estudos que a média de ganho de peso de bezerros de vacas não infestadas pela mosca-do-chifre era maior do que a dos bezerros de vacas infestadas e que quando o número médio de moscas atinge valores entre 300 e 1.000 moscas por animal, há uma diminuição no ganho de peso nos bois e bezerros de 10 a 15 libras por animal. Isto está de acordo com Kunz *et al.* (1984) que relataram em seus estudos, uma diminuição da taxa de ganho de peso em um rebanho exposto a mais de 700 moscas-do-chifre por animal.

A *Haematobia irritans* é originária da Europa e foi introduzida nos Estados Unidos no século XVIII, de onde se difundiu para toda América do Norte e algumas áreas da América Central e do Sul, chegando ao Brasil por Roraima, em 1978, provavelmente vinda da Venezuela. Invadiu o Estado de São Paulo alastrando-se rapidamente. Aproximadamente 6 meses após a





denúncia do primeiro foco, mais de uma centena de outros já haviam aparecido, só na região de São José do Rio Preto.

### I.2. Aspectos biológicos da mosca-do-chifre

Ela apresenta de 2 a 3 mm de comprimento, localizando-se preferencialmente na região dos chifres (daí seu nome), pescoço, cupim, deslocando-se para a região ventral do animal nos horários de sol forte. Uma de suas características é ficar pousada sempre de cabeça para baixo.

Os hábitos de ovoposição da mosca-do-chifre têm sido estudados desde longa data (Ranson, 1908; Sanders & Dobson, 1966; Smith, 1973a, b). Após o acasalamento e maturação dos ovos, a fêmea da mosca-do-chifre deposita seus ovos em fezes bovinas frescas quando estas ainda estão quentes (menos de 15 minutos após a evacuação do boi). Os ovos são depositados em pequenas fissuras nas fezes bovina, sendo que o número médio de ovos por postura varia entre 10 e 15. Cada fêmea tem a capacidade de depositar de 300 a 400 ovos durante o seu ciclo de vida. O período de desenvolvimento de ovo a adulto leva cerca de 10 a 14 dias, dependendo da temperatura do ambiente. A eclosão dos ovos leva entre 14 e 24 horas, o estágio larval entre 5 e 7 dias e o pupal, cerca de 5 dias, em média (Campbell & Thomas, 1992). Nas fezes, os insetos em desenvolvimento passam pelas fases de larva, pupa e emergem como adultos, cuja longevidade pode variar em torno de 28 dias (Guimarães, 1983).

### I.3. Métodos utilizados para controle da mosca-do-chifre

#### A. Principais técnicas e compostos químicos empregados

Drummond *et al.* (1988) e Campbell (1992) fizeram uma revisão sobre as técnicas utilizadas para o controle da mosca-do-chifre. A infestação por este ectoparasita pode ser diminuída utilizando-se várias técnicas, como por exemplo, as pulverizações com inseticidas, injeções de inseticidas no gado, banhos de imersão, aditivos alimentares, administração oral de inseticidas e de compostos que interferem no desenvolvimento ou na muda dos insetos, *pour-ons* (aplicação manual do inseticida, animal por animal), *dust bags* (sacos de inseticidas em pó, pendurados e movimentados na passagem do gado), os brincos de orelha impregnados com inseticidas e até mesmo esquemas de





rotação de pastagem. Todas estas técnicas têm sido utilizadas em grande escala no controle da mosca-do-chifre, com a obtenção de bons resultados. Porém, devemos lembrar que cada uma destas técnicas pode oferecer alguns problemas, como o alto custo econômico, o exaustivo trabalho no manejo do gado e o estresse causado no mesmo, a resistência desta mosca a certos produtos após um determinado tempo de uso, isto sem levar em conta os problemas ecológicos do uso indiscriminado de inseticidas. (Verschoor, 1974; Elliot, 1980).

Vários fatores devem ser considerados para a escolha de uma técnica de controle viável, que esteja de acordo com as condições em que se encontra o rebanho. Muitas vezes, o uso de apenas uma técnica não é suficiente para diminuir consideravelmente a população de *Haematobia irritans*. Nestes casos, faz-se necessária a combinação de várias técnicas para se obter melhores resultados.

Segundo Campbell & Thomas (1992), do ponto de vista prático, o controle da mosca-do-chifre com os brincos de orelha impregnados com inseticidas são o melhor método de tratamento, mas alguns problemas podem surgir com a utilização deste método, como por exemplo, uma possível necrose no local de aplicação do brinco e o aparecimento de populações de *Haematobia irritans* resistentes aos inseticidas.

Para solucionar estes problemas, os autores apresentam algumas recomendações, como a utilização de brincos mais leves, para evitar a necrose e a utilização de vários métodos de controle juntamente com os brincos de orelha, para evitar a resistência. A pulverização com inseticidas e os *dust bags* são exemplos de técnicas que podem ser utilizadas com os brincos de orelha. Além destes fatores, os autores sugerem a utilização de vários inseticidas com mecanismos de ação diferentes e a realização de uma rotação anual no tipo de inseticida utilizado nos brincos de orelha, pois o mesmo inseticida não deve ser utilizado por dois anos seguidos.

Além dos problemas econômicos causados pela mosca-do-chifre, devemos considerar as consequências do uso indiscriminado de inseticidas visando ao controle da mosca. Os inseticidas mais utilizados no controle da mosca-do-chifre são os piretróides e os organofosforados, que são utilizados indiscriminadamente, nas formas de aplicação mais variadas e geralmente sem investigação prévia.





Os piretróides naturais e sintéticos são relativamente seguros para os mamíferos e extremamente tóxicos para os artrópodes, embora doses intravenosas de alguns destes compostos sejam tóxicos aos primeiros. Parte desta relativa não toxicidade dos piretróides aos mamíferos parece estar relacionada com um rápido metabolismo (Soderlund & Cassida, 1977 a, b). Contudo, os mais recentes piretróides sintetizados são mais resistentes à biodegradação e são mais tóxicos aos mamíferos (Barnes & Verschoyle, 1974; Elliott, 1980).

Os inseticidas piretróides em conjunto com o DDT (2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano) e seus análogos, fazem parte de um grupo de compostos químicos que são neurotóxicos aos insetos. Os mecanismos de ação destes compostos são similares. Ambos atuam no sistema nervoso central e no sistema nervoso periférico, em concentrações baixas. A ação nos nervos periféricos, tais como em neurônios motores e sensoriais, é única para esta classe de inseticidas e a necessidade de complexos estudos para determinar o modelo de ação destes inseticidas, torna difícil determinar qual sítio de ação (central ou periférica) deve ser o mais importante na toxicidade destes compostos. Grande parte dos piretróides e DDT possui coeficiente de toxicidade negativo em relação à temperatura, isto é, são mais tóxicos em temperaturas mais baixas.

A maioria dos piretróides sintéticos são ésteres que foram desenvolvidos a partir do produto natural piretrina. Os piretróides mais utilizados como inseticidas são o fenvalerato, o permetrim e o deltametrim. Os sintomas de envenenamento por piretróides são progressivos e incluem hiperatividade, ataxia, convulsões e eventuais paralisias (Coats, 1982). O grau de desenvolvimento dos sintomas dependem do composto químico aplicado, do modo de aplicação e da temperatura. A velocidade de ação na qual o composto paralisa o inseto, depende também de vários fatores, inclusive do tamanho do inseto, isto é, insetos menores (como por exemplo a mosca doméstica e os mosquitos) são paralisados mais rapidamente do que insetos maiores, como as baratas e gafanhotos (Burt & Goodchild, 1971 a, b; Gammon, 1978).

Um outro grupo de compostos amplamente utilizados como inseticidas são os organofosforados. Esta classe de inseticida abrange um grande número de compostos de ação neurotóxica, cujo grau de toxicidade varia nos insetos e mamíferos (Coats, 1982).





Os organofosforados (como por exemplo o malathion, o malaaxon e o paraoxon) e também os carbamatos (por exemplo o carbaril e o propoxur), são compostos inibidores da acetilcolinesterase, uma enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina nas terminações nervosas, e os efeitos biológicos são causados pelo excesso de acetilcolina, resultante da inibição daquela enzima. Estes compostos atuam sobre o sistema nervoso central e os efeitos clínicos dependem da técnica de aplicação e do tempo de exposição ao inseticida. Os principais efeitos clínicos são: miose, broncoconstrição, excesso de secreções, vômito, tonturas, parada respiratória e cardíaca, dor e aumento da pressão ocular, entre outros. No caso dos insetos, o excesso de acetilcolina causa hiperatividade das fibras musculares, seguida de fadiga e paralisia muscular, causando a morte (Sidell, 1994; Mutero *et al.*, 1994).

#### B. Controle biológico e compostos alternativos

A mosca-do-chifre foi controlada por muitos anos por aplicações de inseticidas nos animais infestados, mas existe o problema da resistência ao inseticida que algumas populações de *Haematobia irritans* desenvolveram (Sparks *et al.*, 1985; 1990).

A aquisição de resistência recomenda dosagens maiores de inseticidas para controle das moscas. O aumento na dosagem e a utilização de inseticidas mais potentes causam vários problemas, incluindo a toxicidade aos animais, a ocorrência de resíduos tóxicos na carne e no leite e ainda, a contaminação ambiental. Assim, foram desenvolvidas algumas técnicas que utilizam o controle biológico ou o uso de drogas análogas aos hormônios de crescimento dos insetos, tentando sanar estes problemas.

Muitas espécies de parasitas, predadores e competidores são conhecidos por terem um importante papel no aumento da taxa de mortalidade de estágios imaturos da mosca-do-chifre, como por exemplo diversas espécies de besouros e alguns bacilos (Blume *et al.*, 1970; Thomas & Morgan, 1972; Temeyer, 1984; Fincher & Morgan, 1990 e Roth *et al.*, 1991). O uso efetivo destes agentes biológicos para a diminuição da população da mosca-do-chifre pode reduzir a quantidade de inseticidas utilizados em seu combate. Estudos recentes de predadores de *Haematobia irritans* revelaram que os besouros pertencentes às famílias de histerídeos e escarabídeos são importantes





agentes biológicos que influenciam a taxa de mortalidade deste ectoparasita (Summerlin *et al.*, 1982; 1983; 1984; 1990; 1991a, b e Roth *et al.*, 1991). Summerlin realizou uma série de estudos de controle biológico, em populações de *Haematobia irritans* mantidas em laboratório, utilizando como predadores algumas espécies diferentes de besouros e observou que houve uma redução populacional significativa, graças à predação dos estágios imaturos (ovo, larva e pupa), que nesta fase do desenvolvimento habitam as fezes bovinas. Contudo, segundo este autor, testes laboratoriais que relacionam a densidade presa-predador podem não fornecer dados acurados do efeito de tais predadores na natureza. Muitos fatores como o clima, preferências por habitats, fecundidade e a presença de espécies de presas alternativas podem influenciar a taxa de predação da espécie em questão. Porém, os resultados destes estudos demonstram que diferentes espécies de besouros predadores possuem diferentes habilidades de predação da mosca-do-chifre. Com base nestas observações, podemos concluir que uma técnica viável para o controle deste organismo seria a introdução das espécies de besouros predadores mais eficientes, tais como: *Onthophagus gazella*, *Phelister panamensis*, *Hister coenosus*, *Aleochara* sp, entre outros.

Outros agentes biológicos considerados seguros, que podem ser utilizados no controle da mosca-do-chifre são algumas bactérias. A bactéria *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* é considerada tóxica para as larvas de várias famílias de dípteros aquáticos, tais como os mosquitos e algumas moscas. Esta bactéria produz as duas maiores classes de toxinas que agem como inseticidas (Luthy, 1980), a  $\beta$ -exotoxina e a  $\delta$ -endotoxina. A  $\beta$ -exotoxina, segundo a revisão de Sebesta *et al.* (1981), é eficiente contra vários tipos de insetos, incluindo os dípteros, mas também possui efeitos tóxicos para os vertebrados. A  $\delta$ -endotoxina é uma proteína cristalizada insolúvel, produzida durante o processo de esporulação, que não possui toxicidade contra os vertebrados, sendo por isso, um bom agente para controle biológico. Esta toxina é responsável pelas propriedades tóxicas da bactéria *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* contra moscas e mosquitos.

Temeyer (1984) realizou experimentos para verificar se a proteína cristalizada do *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* seria tóxica para as larvas não-aquáticas de dípteros, utilizando larvas de mosca-do-chifre. Nestes experimentos, as larvas da mosca-do-chifre recém-eclodidas foram colocadas em placas de Petri (10 larvas por placa), que continham um meio





preparado com fezes bovinas, água e as frações das culturas de bactérias que seriam testadas. Foram utilizadas frações purificadas de células vegetativas e de células esporuladas. Para obtenção dos resultados, foram realizadas contagens de pupas e moscas emergentes. Em alguns experimentos, a fração extraída de células vegetativas mostrou-se pouco tóxica (taxa de mortalidade inferior a 50%, utilizando-se 0,5 mg/g da fração). Já a fração extraída de células esporuladas mostrou-se altamente tóxica (100% de mortalidade, utilizando-se 0,5 mg/g da fração e 84% quando a concentração da fração utilizada foi de 0,1 mg/g). Com base em seus resultados, Temeyer demonstrou que a proteína cristalizada extraída do *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* era tóxica para a mosca-do-chifre e que ela produz morte rápida em estágios pré-pupais do desenvolvimento da larva. A ausência de toxicidade desta proteína aos vertebrados, quando se encontra em seu estado nativo cristalino, faz com que seja uma excelente candidata para uso no controle da mosca-do-chifre. Possíveis modificações no gene que codifica a  $\delta$ -endotoxina e sua clonagem em um vetor podem fornecer um novo agente para o controle biológico, com maior toxicidade e maior especificidade a um inseto, produzindo assim, um inseticida biológico seguro e que não cause riscos para o ambiente.

Substâncias análogas aos hormônios reguladores de crescimento nos insetos também podem ser utilizadas no controle de ectoparasitas bovinos. Uma substância análoga ao hormônio juvenil, o metopreno, inibe o desenvolvimento da mosca-do-chifre (Thomas, 1984). As fezes podem ser tratadas diretamente com este composto químico, ou ainda, ele pode ser administrado na água do rebanho ou fornecido como grãos de minerais. A inibição do desenvolvimento causado por esta droga ocorre preferencialmente na fase larval. Ivey *et al.* (1982) demonstraram que a presença de resíduos de metopreno nos tecidos do gado pode ser detectada até 90 dias após o tratamento. Sendo assim, os adultos da mosca que sugam o sangue do boi podem ingerir o metopreno, ao se alimentarem.

A reprodução dos insetos é um processo mediado por hormônios circulantes, como o hormônio juvenil. Este hormônio está envolvido em uma série de processos metabólicos, inclusive a vitelogênese e a segregação de hormônios gonadotróficos em várias espécies de dípteros. Contudo, há uma considerável variação nas funções do hormônio em diferentes espécies de moscas.





Thomas (1984) verificou os possíveis efeitos do tratamento com metopreno na fecundidade, na viabilidade do ovo e na sobrevivência dos adultos de *Haematobia irritans*. A droga foi adicionada ao sangue e este foi fornecido na dieta alimentar das moscas normais. Os dados obtidos neste experimento mostraram que as fêmeas tratadas com metopreno ovopositaram um número maior de ovos do que as fêmeas não-tratadas, que faziam parte do grupo controle, porém a viabilidade destes ovos era muito menor, isto é, cerca de 35% do total de ovos ovopositados não eclodiram. Embora esteja bem estabelecido que o hormônio juvenil participe de importantes processos oogênicos em alguns dípteros, seu efeito na fecundidade não foi ainda demonstrado. Não foram encontradas diferenças na taxa de sobrevivência entre moscas normais e moscas tratadas. Com base neste experimento, Thomas concluiu que o uso de drogas análogas do hormônio juvenil, combinadas com outras técnicas, pode ser um meio seguro e viável para o controle da mosca-do-chifre.

#### I.4. Aspectos relacionados com a aquisição de resistência aos inseticidas

Segundo Mutero *et al.* (1994) embora a resistência ao inseticida seja um grave problema para a agricultura, a pecuária e a saúde pública, este fenômeno também fornece um bom modelo para o estudo da adaptação dos eucariontes a um ambiente tóxico. A resistência pode resultar de vários mecanismos, como por exemplo: redução na absorção do inseticida, aumento da sua metabolização pelas esterasas, oxidases ou glutathione-transferases, e ainda, modificação do alvo do inseticida. Até hoje, pouco se conhece a respeito da origem genética da resistência ao inseticida, a nível molecular. Contudo, alguns autores demonstraram que este fenômeno pode se originar a partir de amplificação gênica (Mouches *et al.*, 1986; 1987; Field *et al.*, 1988; Bonning *et al.*, 1991; Ketterman *et al.*, 1992; Raymond *et al.*, 1993) e mutações em ponto (Fournier *et al.*, 1992; Constant *et al.*, 1993).

Mutero e seus colaboradores identificaram mutações em ponto presentes no gene que codifica para acetilcolinesterase (AChE), em linhagens mutantes de *D. melanogaster*, e demonstraram que, altos níveis de resistência são obtidos pela combinação de várias mutações em ponto, no mesmo sítio ativo da enzima. Estes autores utilizaram algumas linhagens isoladas por Morton & Singh (1982) e também estudadas por Pralavorio & Fournier (1991), resistentes aos





inseticidas organofosforados e carbamatos. Para a identificação de mutações associadas com a resistência, foi determinada a sequência de nucleotídeos das regiões codificadoras do gene para AChE. Cinco mutações foram encontradas: Phe (115) → Ser, Ileu (199) → Val, Ileu (199) → Thr, Gly (303) → Ala e Phe (368) → Tyr. Estas mutações, ocorrendo em diferentes posições do gene, são as responsáveis pela resistência aos inseticidas. Cada uma delas conduz a um padrão diferente de resistência, modificando a sensibilidade da enzima aos inseticidas. A maioria das linhagens resistentes mostraram combinações de várias mutações, sugerindo que, um alto nível de resistência se origina a partir de várias combinações de pequenas mutações responsáveis por uma resistência mais fraca, e não uma única mutação produzindo alta resistência. Isto está de acordo com Pralavorio & Fournier (1991) que encontraram, em seus estudos, uma linhagem de *D. melanogaster* com uma mutação em ponto (Phe (368) → Tyr) que conferia, a esta linhagem, uma resistência fraca. Mutero e seus colaboradores discutem ainda que, a recombinação entre mutações isoladas pré-existentes, também contribui para a combinação de várias mutações em uma mesma proteína. Esta possibilidade de aquisição de resistência por recombinação intracistrônica é interessante, uma vez que permite explicar algumas características observadas na resistência dos insetos. Exemplos de insetos que são resistentes por mais de um mecanismo, devido à diferentes genes, têm sido estudados. É comum admitir que a resistência pode resultar de eventos de recombinação entre dois ou mais genes. A extensão dos mecanismos de recombinação às mutações dentro de um único gene pode explicar a frequência de ocorrência de resistência nos insetos. Além disso, a recombinação intracistrônica é um evento mais frequente do que as mutações em ponto: King & Jules (1969) estimaram a taxa de substituição de nucleotídeos em cerca de  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  por códon, por geração, enquanto que a frequência do *crossing-over* entre duas mutações no loco *Ace* de *D. melanogaster* (loco que codifica para a enzima AChE) está próximo de  $10^{-5}$ . A estrutura altamente dividida (*spliced*) dos genes para AChE nos insetos, favorece grandemente a recombinação (Fournier *et al.*, 1987). Finalmente, a existência de várias mutações em ponto e a ocorrência de recombinação intracistrônica entre as mutações constituem mecanismos para a aquisição de resistência aos inseticidas.

Outro mecanismo pelo qual vários insetos adquirem resistência aos inseticidas organofosforados e carbamatos é a superprodução de enzimas esterásicas, devido à amplificação





gênica. Este fenômeno pode ser evidenciado em várias espécies de insetos e tem sido amplamente estudado no afídio *Myzus persicae* e em mosquitos do gênero *Culex* (Mouches *et al.*, 1986; 1987; Bonning *et al.*, 1991; Ketterman *et al.*, 1992 e Raymond *et al.*, 1989; 1993). Devonshire *et al.*, (1977; 1979; 1982; 1986 e 1993) e Field *et al.* (1988) realizaram uma série de estudos bioquímicos e moleculares, verificando que, em *M. persicae*, a resistência resulta do aumento da síntese de uma enzima esterásica, a E4. Esta enzima é uma glicoproteína que hidrolisa e sequestra a molécula do inseticida. Em afídios resistentes, o nível do RNAm E4 é mais elevado do que em afídios susceptíveis aos inseticidas, indicando que a amplificação gênica seria o provável mecanismo causador da resistência. Nesta espécie, a expressão dos genes amplificados é perdida quando os insetos são criados na ausência do inseticida e a resistência aos organofosforados desaparece, enquanto que a amplificação permanece.

Mouches *et al.* (1986; 1987) desenvolveram técnicas imunológicas para quantificar a síntese de enzimas esterásicas envolvidas na desintoxicação de organofosforados em *Culex*, e demonstraram que em linhagens de mosquitos resistentes, contendo o gene que codifica para esterases, amplificado, estas enzimas são produzidas de 70 a 500 vezes mais do que em linhagens de mosquitos susceptíveis. Dois tipos de esterases, A e B, estão envolvidas no processo de desintoxicação. Estas enzimas possuem mobilidades eletroforéticas diferentes, dependendo da espécie e da origem do mosquito e podem receber denominações diferentes (A1 em *C. pipiens*; A2, B1 e B2 em *C. quinquefasciatus*; A3 e B3 em *C. tarsalis*). Em mosquitos resistentes devido ao aumento da desintoxicação dos inseticidas por estas enzimas, há uma superprodução de um único tipo de esterase (A) ou ambos os tipos (A e B).

Raymond *et al.* (1989; 1993) analisaram a estabilidade da resistência aos organofosforados devida à amplificação dos genes para as esterases B1 e B2. Estes autores verificaram que, a amplificação do gene B1 está presente em todas as fases do ciclo de vida das linhagens analisadas, sugerindo que este evento é constitutivo. As esterases B1 e B2 são superproduzidas já no primeiro estágio larval e o são até a fase adulta, indicando que não há uma variação devida à regulação gênica de acordo com a idade. Contudo, há ocorrência de regulação gênica tecido-específica. Os resultados obtidos por Raymond e seus colaboradores revelaram que





ambos os genes para as esterases B1 e B2 amplificados, continuam se expressando no mosquito, três anos após a completa remoção da seleção pelo inseticida. Esta situação difere da espécie *Myzus persicae*, na qual a expressão de genes esterásicos amplificados que conferiam resistência aos organofosforados é perdida, após poucas gerações mantidas na ausência deste inseticida.

### 1.5. Classificação e função das enzimas esterásicas

As esterases (hidrolases de ésteres carboxílicos, E.C.3.1.1) pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente os ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar, também, sobre outros substratos que contenham ligações amidas. Embora a especificidade aos substratos dessas enzimas possa ser limitada *in vivo*, algumas são capazes de hidrolisar uma ampla classe de substratos *in vitro* (Oakeshott *et al.*, 1993).

O fato das esterases serem capazes de hidrolisar um vasto grupo de substratos *in vitro*, e o avanço das técnicas de análise eletroforética, tornaram possível a classificação de várias esterases em grupos distintos. Mais de 20 enzimas esterásicas foram classificadas por este método, em diversas espécies de organismos (Holmes & Masters, 1967; Coats *et al.*, 1975; Walker & Mackness, 1983; Oakeshott *et al.*, 1993; Walker, 1993). Entretanto, este fator possui uma desvantagem: outros critérios são requeridos para uma classificação funcional das esterases.

O estudo das esterases, bem como tentativas de classificação das mesmas, têm sido feitos de longa data. Aldridge (1953) classificou as esterases em dois grupos, a partir da medida de atividade destas enzimas na presença do organofosforado E600 (dietil-p-nitrofenil-fosfato ou paraoxon). Segundo este autor, as A-esterases (esterases aromáticas ou arilesterases, E.C.3.1.1.2) são aquelas que hidrolisam preferencialmente os ésteres aromáticos (por exemplo, o fenil acetato) e não são inibidas por organofosforados. Na verdade, essas enzimas são capazes de hidrolisá-los. As arilesterases estão presentes, principalmente, no plasma de mamíferos, como por exemplo, no soro de gato, coelho, doninha, cabra, carneiro, vaca, cavalo e homem. Um segundo grupo proposto por este autor são as B-esterases (esterases alifáticas ou aliesterases), que são inibidas pelos organofosforados através de uma fosforilação irreversível de um resíduo de serina em seu centro ativo (Junge, 1984). Aldridge (opus cit) detectou a presença de B-esterases, em quantidades maiores, no plasma de rato,





porco-da-Guiné e no gato e, em quantidades menores, no pato e no cavalo. O grupo das B-esterases compreende as serino-hidrolases e pode ser subdividido, com base no padrão de inibição pelo sulfato de eserina, em carboxilesterases (E.C.3.1.1.1, resistentes à eserina) e colinesterases. Este último grupo, por sua vez, pode ser subdividido em acetilcolinesterases (E.C.3.1.1.7), encontradas na maioria dos vertebrados e invertebrados, e as pseudocolinesterases (E.C.3.1.1.8), encontradas nos vertebrados, algumas plantas e microorganismos.

Outra classificação feita por Holmes & Masters (1967) leva em conta a ação dos reagentes de grupos sulfidrílicos, tais como o pCMB (p-cloromercuribenzoato), o pOHMB (p-hidroximercuribenzoato), o beta-mercaptoetanol e o ácido iodoacético, além dos inibidores já citados (o sulfato de eserina e os organofosforados: paraoxon, fenitrooxon e o DFP ou diisopropil fluorofosfato). A classificação de esterases mais utilizada, é baseada na sensibilidade destas enzimas a estes inibidores (Oakeshott *et al.*, 1993). Segundo essa classificação, as esterases podem ser subdivididas em:

1. Carboxilesterases = são inibidas somente por organofosforados e geralmente preferem ésteres alifáticos de cadeia longa;
2. Arilesterases = são inibidas somente por reagentes sulfidrílicos e cátions metálicos bivalentes, como  $Hg^{2+}$  e o  $Cu^{2+}$ , geralmente preferem substratos aromáticos;
3. Colinesterases = são inibidas por organofosforados e sulfato de eserina, e preferem substratos carregados (como os ésteres de colina), do que ésteres aromáticos e alifáticos;
4. Acetilesterases = não são afetadas por nenhum dos inibidores e geralmente preferem substratos alifáticos, derivados do ácido acético.

Nos últimos anos, outros inibidores de esterases têm sido utilizados na tentativa de desvendar outras características dessas enzimas. O PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), descrito inicialmente como um inibidor específico de serino-proteases, como a tripsina, é hoje reconhecido como um inibidor de serino-esterases (Sekar & Hageman, 1979). Esse fato reforça as evidências de que as esterases estão relacionadas filogeneticamente às serino-proteases, formando a família multigênica das serino-hidrolases (Heymann, 1980). Assim, o PMSF poderia ser considerado um inibidor geral das serino-hidrolases, englobando as serino-proteases e as serino-esterases.





44 kDa. No inseto *O* NaF (fluoreto de sódio) é utilizado como inseticida para o controle de baratas e formigas e, foi demonstrado que, este composto também atua como inibidor das pseudocolinesterases (Whittaker, 1984) e de esterases em leucócitos e plaquetas humanas (Dufer *et al.*, 1984). Em insetos as informações relacionadas com a inibição de esterases por este composto são escassas e segundo Oakeshott *et al.* (1993), nenhuma enzima com característica bioquímica de pseudocolinesterase foi descrita em *Drosophila* ou outros insetos. Contudo, Bitondi & Mestriner (1983) relataram a inibição de três esterases em pupas bem desenvolvidas de *Apis mellifera*, com NaF na concentração de 20 mM, mas esses autores não realizaram uma classificação para estas três enzimas.

As carboxilesterases constituem um grupo de esterases que estão amplamente distribuídas na natureza. Elas catalisam a hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos em ácido e álcool livres. Os substratos mais comumente hidrolisados, por elas, são os ésteres alifáticos de cadeia curta (de 3 a 6 carbonos). Além dos ésteres alifáticos, os ésteres aromáticos, as amidas aromáticas e os tioésteres também são substratos para estas enzimas (Junge, 1984). As carboxilesterases mais bem estudadas são as que ocorrem em fígado de mamíferos, inclusive no homem (Junge & Krish, 1975; Heymann, 1980; Robbi & Beaufay, 1994; Huang *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1994). Estas enzimas do fígado estão na face citoplasmática da membrana do retículo endoplasmático, provavelmente mantidas por ligações hidrofóbicas com os fosfolipídios. Elas compreendem cerca de 5 a 7% do total de proteínas microsossomais. A maioria das carboxilesterases isoladas do fígado dos mamíferos são proteínas triméricas, isto é, esterases com 3 subunidades ou 3 cadeias polipeptídicas idênticas, cada uma com massa molecular de 60 kDa, contendo um centro ativo em cada subunidade. O papel fisiológico destas enzimas não é ainda conhecido. Alguns autores acreditam que elas participem do metabolismo de ésteres ou amidas, auxiliando o sistema de desintoxicação do organismo (Heymann, 1980; Junge, 1981).

As arilesterases são encontradas principalmente no plasma de mamíferos. O sítio de síntese destas enzimas não é conhecido, e nem seu papel fisiológico. Alguns autores acreditam que as arilesterases possam ser produzidas nos rins ou no fígado. Existem poucas informações a respeito das suas propriedades moleculares. Uma arilesterase isolada do soro bovino, apresenta peso molecular de





44 KDa. No homem, foi detectada outra enzima com 24 KDa que talvez esteja relacionada com lipoproteínas do soro (Junge, 1984).

As colinesterases são esterases que hidrolisam ésteres de colina. São inibidas por organofosforados e sulfato de eserina (Oakeshott *et al.*, 1993). Estas esterases estão presentes em todos os organismos e constituem uma das famílias enzimáticas mais polimórficas. As colinesterases estão subdivididas em: acetilcolinesterases (E.C.3.1.1.7) e pseudocolinesterases (E.C.3.1.1.8).

Segundo Whittaker (1984), as acetilcolinesterases estão localizadas nas membranas de algumas células de vertebrados (por exemplo, nos eritrócitos) e invertebrados. Esta enzima controla as correntes iônicas nas membranas excitáveis e possui um papel essencial nos processos de condução nervosa e nas junções neuromusculares. Estão presentes nas massas cinzenta e branca do cérebro, no fluido amniótico e na placenta. Vários estudos demonstraram que as acetilcolinesterases são enzimas importantes no Sistema Nervoso Central. Elas finalizam o impulso nervoso catalisando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. As acetilcolinesterases também são importantes no sistema nervoso dos insetos e o estudo das mesmas direcionou o desenvolvimento de inseticidas que atuam como inibidores destas enzimas. Duas classes de compostos, os inseticidas organofosforados e os carbamatos, são utilizados como inibidores quase irreversíveis destas enzimas. A conformação destes compostos é análoga à estrutura do substrato natural das acetilcolinesterases, a acetilcolina (Mutero *et al.*, 1994).

As pseudocolinesterases, também conhecidas como butirilcolinesterases ou benzoilcolinesterases, podem ser encontradas em muitos órgãos de vertebrados, como por exemplo, no fígado e na massa cinzenta do cérebro. Seu papel fisiológico ainda não está estabelecido, mas deve estar envolvida em processos metabólicos importantes, uma vez que é encontrada em microorganismos, tecidos vegetais e nos vertebrados (Whittaker, 1984; Soreq *et al.*, 1989 e Oakeshott *et al.*, 1993).

Diferentes tipos de esterases têm sido caracterizadas e purificadas em inúmeros organismos. Como exemplo, podemos destacar as esterases das bactérias *Salmonella enterica* (Brisabols & Goulett, 1993) e *Bacillus subtilis* (Sekar & Hageman, 1979), de leveduras (Lee *et al.*, 1987), e de plantas, como a *Casuarina equisetifolia* (Maggia *et al.*, 1993) e a *Malus pumila*





(Manganaris & Alston, 1992). O estudo de esterases em insetos é muito amplo sendo que, dentre eles os dípteros são os mais estudados, incluindo várias espécies do gênero *Drosophila* (Ceron, 1988; Lapenta, 1992; Nanya, 1993; Myers *et al.*, 1993; Karotam *et al.*, 1993 e Barker, 1994), a mosca doméstica *Musca domestica* (Motoyama & Dauterman, 1974; Kao *et al.*, 1985a, b), a mosca da fruta oriental *Dacus dorsalis* (Yong, 1986), vários mosquitos, como *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens*, *Anopheles stephensis*, *Anopheles albimanus* (Miller & Novak, 1983; Maruyama *et al.*, 1984; Karunaratne *et al.*, 1993; Sahgal *et al.*, 1994 e Argentine & James, 1995), besouros como *Sitophilus oryzae*, *Palembus dermestoides* (Sudderuddin & Lim, 1978) e *Tribolium castaneum* (Mackness *et al.*, 1983), e no grilo como *Gryllus assimilis* (Gu & Zera, 1994), *Gryllus rubens* (Zera & Tiebel, 1989) e *Gryllus bimaculatus* (Hoffmann *et al.*, 1994). Nos mamíferos, as esterases têm sido amplamente estudadas em ratos (Morgan *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1994 e Robbi & Beaufay, 1994), camundongos (Deimiling & Wassmer, 1991), coelho (Aldridge, 1953; Lith *et al.*, 1989) e porco-da-guiné (Bradley *et al.*, 1994), entre outros.

Nos insetos, as esterases parecem estar envolvidas em pelo menos três importantes atividades fisiológicas, como a regulação dos níveis de hormônio juvenil (Kort & Granger, 1981; Jones *et al.*, 1981, 1982, 1986 e 1994; Hanzilik & Hammock, 1988; Rauschenbach *et al.*, 1984), a degradação de inseticidas (Motoyama & Dauterman, 1974; Kao *et al.*, 1985a, b) e processos digestivos (Kapin & Ahmad, 1980; Jones & Brancoft, 1986; Timmermans *et al.*, 1994 e Argentine & James, 1995).

O estudo das esterases relacionadas com a degradação do hormônio juvenil tem sido realizado por muitos pesquisadores. Hanzilik *et al.* (1989) e Harshman *et al.* (1994) clonaram e sequenciaram um gene que codifica para uma esterase, a esterase JH, relacionada com a degradação deste hormônio, presente na mariposa *Heliothis virescens*, uma importante praga agrícola. O hormônio juvenil, como mencionado anteriormente, está envolvido intimamente na regulação do desenvolvimento dos insetos, atuando na vitelogênese, na síntese e secreção das glândulas acessórias reprodutivas das fêmeas e na produção de feromônios, entre outros. Embora os detalhes do mecanismo de ação deste hormônio não estejam totalmente conhecidos, sabe-se que sua precisa modulação é necessária para a ocorrência da oogênese, da metamorfose e de outros eventos





fisiológicos do desenvolvimento dos insetos. Para que a metamorfose ocorra, o nível do hormônio juvenil deve diminuir durante o último ínstar larval. A esterase JH, é membro do grupo das carboxilesterases, e possui um papel crucial na diminuição da taxa do hormônio juvenil em insetos lepdópteros, hidrolisando o metil-éster, presente neste hormônio, no momento certo. Essa enzima possui importante papel na regulação da taxa de metamorfose, na reprodução e no polimorfismo de alguns insetos. Devido à sua função, o estudo dessa enzima contribuiu para o entendimento de como a metamorfose se inicia nestes organismos. A secreção da esterase JH na hemolinfa é um dos primeiros sinais fisiológicos de que a metamorfose se inicia. No período final do desenvolvimento de algumas larvas, o próprio hormônio juvenil parece induzir a ação desta enzima, que por sua vez, o elimina da circulação. Além deste importante papel na metamorfose de *Heliothis virescens*, Hanzilik *et al.* (1989) e Harshman *et al.* (1994) sugeriram uma extensão prática dos seus resultados para o desenvolvimento de novos inseticidas biológicos, baseados nos mecanismos de regulação da expressão do gene que codifica para a esterase JH, visando ao controle de insetos e pragas agrícolas.

Em outras espécies, o papel das esterases que degradam o hormônio juvenil, também tem sido bastante estudado, abrangendo, por exemplo, *Locusta migratoria* (Debernard & Couillaud, 1994), *Manduca sexta* (Hidayat & Goodman, 1994), algumas espécies do gênero *Gryllus* (Zera & Tiebel, 1989; Hoffman *et al.*, 1994; Gu & Zera, 1994) e *Trichophusia ni* (Venkatesh *et al.*, 1988; Venkatesh & Roe, 1989; Jones *et al.*, 1994).

No gafanhoto *Locusta migratoria*, Debernard & Couillaud (1994) relataram que um homólogo do hormônio juvenil presente na hemolinfa, o hormônio juvenil III (HJ III), liga-se a uma proteína de ligação BP. Assim sendo, a maior parte do HJ III circulante estaria ligada a esta proteína, cuja principal função seria transportá-lo do seu local de síntese (a glândula corpora allata), para os tecidos específicos nos quais deve agir. Segundo os autores, além do transporte do hormônio juvenil, esta associação também seria de grande importância para sua proteção contra a degradação por esterases presentes na hemolinfa. Nesta espécie, as carboxilesterases não são esterases específicas para a degradação do hormônio juvenil, mas possuem funções variadas, degradando diversos substratos, inclusive este hormônio. Contudo, o papel destas enzimas na regulação das taxas de hormônio juvenil em *Locusta migratoria*, permanece ainda incerto.





Em várias espécies de grilos, o único homólogo do hormônio juvenil encontrado é o HJ III. O aumento nas taxas de síntese deste hormônio durante o período de pré-oviposição está correlacionado com a vitelogênese e o rápido crescimento do oócito. Hoffmann *et al.* (1994) realizaram uma série de estudos em *Gryllus bimaculatus* a fim de verificar uma possível variação temporal da atividade das esterases que degradam o hormônio juvenil, presentes na hemolinfa, durante a fase adulta de machos e fêmeas desta espécie, tentando relacionar esta variação de atividade enzimática com mudanças na taxa de síntese do HJ III. Os resultados obtidos por esses autores serão relacionados a seguir.

Em fêmeas, a atividade das esterases que degradam o hormônio juvenil variaram durante a fase adulta, sendo que esta foi menor logo após a emergência do adulto e aumentou rapidamente nos primeiros dias de vida adulta. Após o 8º dia, a atividade esterásica declinou até o 16º após a muda, mas um outro pico de atividade foi verificado no 32º dia, próximo ao final da vida adulta. Nos machos, a atividade esterásica também foi baixa nos indivíduos adultos recém-emergidos, mas aumentou rapidamente até o 4º dia de vida adulta, declinando após este. Um outro aumento na taxa de atividade enzimática também foi observado no 20º dia de vida adulta dos machos. Aqueles autores (Hoffmann *et al.*, 1994) demonstraram claramente a presença de atividade de enzimas esterásicas que degradam o HJ III na hemolinfa de adultos de *G. bimaculatus* e mostraram que, a atividade destas enzimas é baixa em indivíduos que sofreram a ecdise recentemente, mas aumenta e sofre variações ao longo da vida adulta. Os valores desta atividade foram da mesma ordem que os encontrados em outras espécies de grilos, como por exemplo, em *Acheta domesticus* (Renucci *et al.*, 1984) e *Gryllus rubens* (Zera & Tiebel, 1989), mas os valores em *Gryllus bimaculatus* foram 10 vezes maiores do que os medidos em baratas (*Periplaneta americana*, em De Kort *et al.*, 1979) e *Diploptera punctata* (Rotin *et al.*, 1982). Hoffmann e seus colaboradores concluíram que as modificações nos níveis do HJ III presentes na hemolinfa de grilos adultos seriam governadas por variações na taxa de biossíntese do HJ III na corpora allata, que é de controle neuroendócrino, e por variações na sua taxa de degradação efetuada graças à atividade de enzimas esterásicas. Com relação ao controle da taxa deste hormônio relacionado com as proteínas de ligação observadas em outras





espécies, como em gafanhotos (descritos anteriormente), os autores sugerem que mais estudos sejam realizados a este respeito.

Outro importante papel fisiológico das enzimas esterásicas, já mencionado, está relacionado com a degradação de inseticidas. Esta função esterásica tem sido objeto de muitos estudos, particularmente nos insetos. Em geral, a ação de carbamatos, organofosforados e piretróides, sobre os insetos, ocorre através da inibição de colinesterases e/ou carboxilesterases. Por outro lado, esses compostos podem ser metabolizados em produtos inócuos, nesses organismos, através da ação de carboxilesterases e/ou fosfatases (Sudderuddin & Lim, 1978).

As esterases têm sido relacionadas com a resistência aos inseticidas organofosforados. Várias linhagens de moscas domésticas resistentes são capazes de degradar inseticidas como o diazoxon, o malaoxon e o malathion. As carboxilesterases podem degradar este último composto a um monoácido (metabólito do malathion), constituindo o principal mecanismo de resistência contra este inseticida exibido por várias espécies de insetos. As hidrolases também estão relacionadas com a degradação de inseticidas organofosforados. Hidrolases fosfotriéster quebram a ligação anidrido-fosfórica, embora as carboxilesterases e as carboxilamidases sejam responsáveis pela clivagem das ligações C—O e C—N, respectivamente. As hidrolases fosfotriéster são responsáveis pela hidrólise do diazoxon e do paraoxon, enquanto que as carboxilesterases estão envolvidas na desintoxicação do malathion e acethion, pela hidrólise dos grupos carboxilester.

Kao *et al.* (1985a, b) estudaram diferentes linhagens de mosca doméstica resistentes e sensíveis ao inseticida malathion. Nestes estudos, duas linhagens sensíveis foram tratadas com doses de malathion que causava uma taxa de mortalidade de 60% a 90%. Após a seleção com este inseticida, a atividade das carboxilesterases foi medida e verificou-se que esta havia aumentado de 3 a 4 vezes nas linhagens que antes eram susceptíveis. Estes resultados mostram que este pode ser o principal mecanismo envolvido na aquisição de resistência, porém, uma combinação de fatores deve ser responsável pela resistência ao malathion nas moscas domésticas. Uma linhagem pouco resistente a este inseticida, mostrou baixa atividade carboxilesterásica, porém alta atividade de hidrolases fosfotriéster em adição ao mecanismo oxidativo, explicando assim, os baixos níveis de resistência. Outras linhagens resistentes também exibiram alta atividade de hidrolases fosfotriéster, em adição a





um aumento na atividade carboxilesterásica. Uma vez que o padrão para a atividade destas duas enzimas foi diferente nas linhagens analisadas, seria esperado que as reações fossem catalisadas por enzimas distintas, ou por diferentes isoenzimas. De fato, os resultados obtidos por Kao *et al.* (1985a, b) sugerem que mais de uma esterase estejam envolvidas na resistência aos organofosforados.

Zerba & Casabé (1980) e Zerba *et al.* (1984) contribuíram com seus estudos em *Triatoma infestans*, o vetor da Doença de Chagas, para o entendimento da importância das esterases nos insetos e a degradação de inseticidas organofosforados por estas enzimas. Os autores utilizaram o sobrenadante resultante da centrifugação do homogeneizado do tórax de *T. infestans* para a realização da eletroforese e, em seguida, os géis foram testados com os inseticidas paration e paraoxon. Os resultados indicaram que o padrão de degradação de ambos os substratos foi semelhante. As bandas foram numeradas de acordo com suas respectivas posições nos géis, ou seja, com seu padrão de migração. Somente uma esterase, a de posição IX, caracterizada como arilesterase degradou ambos os substratos. Esta enzima parece ter um importante papel no metabolismo de organofosforados nesta espécie, pois ambos os compostos (fosfatos e fosforotionatos) foram hidrolisados por ela. Uma outra enzima, a de posição V, foi responsável pela hidrólise apenas do paration, sendo classificada como acetilcolinesterase. Uma outra banda foi verificada quando os autores coraram os géis somente para proteínas. Esta banda localizava-se entre as posições VIII e IX, hidrolisando apenas o paration. Isto sugeriu a presença de uma esterase com alta especificidade aos inseticidas organofosforados. Zerba e seus colaboradores (1984) isolaram a enzima classificada como arielesterase e confirmaram seu importante papel na degradação de inseticidas, mas devido à sua grande importância toxicológica na hidrólise de compostos xenobióticos, esta esterase requer melhores estudos afim de determinar se se trata de uma verdadeira arilesterase.

Outra importante função das esterases está relacionada com a participação em processos digestivos. Jones & Bancroft (1986) utilizaram a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para detectar a presença destas enzimas em diferentes tecidos de *Anthonomus grandis*, analisados separadamente (intestino, túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, testículos e ovários) e sugeriram o provável papel fisiológico das mesmas. Foram encontrados cinco locos esterásicos polimórficos, com várias variantes eletroforéticas. Entre as enzimas analisadas, a mais abundante foi a





EST 4, detectada no intestino, relacionada com a digestão dos alimentos ingeridos.

Argentine & James (1995) caracterizaram a atividade enzimática esterásica na glândula salivar e na saliva de *Aedes aegypti*, utilizando vários testes com substratos, inibidores, eletroforese em gel de poliacrilamida e cromatografia de afinidade. A saliva de insetos hematófagos contém um grande número de proteínas e enzimas que facilitam o processo de alimentação, como por exemplo, inibidores da agregação de plaquetas, agentes vasodilatadores, anticoagulantes e enzimas associadas com a ingestão de açúcar. Os autores identificaram três esterases específicas da glândula salivar de fêmeas e machos adultos deste mosquito. A esterase com maior atividade e de maior massa molecular (65 kDa) foi denominada EST-GS e nenhuma outra enzima correspondente foi encontrada em outras fases do desenvolvimento ou em outros tecidos do corpo. As duas outras esterases detectadas na glândula salivar apresentaram uma atividade muito menor do que a EST-GS e, uma delas foi detectada em todos os estádios de desenvolvimento, enquanto que a outra (a de menor atividade), está relacionada a uma esterase ligada ao exoesqueleto adulto. Diferentemente de outros mosquitos, a EST-GS mostrou a mesma atividade frente aos substratos  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetato. Nos machos a atividade da EST-GS medida foi menor e mais constante do que nas fêmeas, nas quais esta enzima atinge altos picos de atividade entre o segundo e terceiro dia de vida após a eclosão. Esses estudos demonstraram que a EST-GS é secretada na saliva, está relacionada com o mecanismo de alimentação destes mosquitos e que ela pode ser uma esterase específica das fêmeas, porém outros estudos ainda são necessários para esclarecer estas dúvidas.

Algumas enzimas esterásicas estão ainda envolvidas no comportamento reprodutivo. No gênero *Drosophila*, por exemplo, várias espécies apresentam esterases em apenas um dos sexos, sendo denominadas esterases sexo-específicas. Os machos de *D. aldrichi* e de *D. dunni*, por exemplo, apresentam, no sistema reprodutivo uma beta-esterase denominada esterase-F (Johnson *et al.*, 1966; 1968; Kambysellis *et al.*, 1968) e (Carrasco *et al.*, 1984). Já os machos de *D. mulleri* e *D. arizonensis* apresentam duas alfa-esterases específicas, a est-10 e a est-12. Em estudos realizados por Ceron (1988) ficou demonstrado que *D. arizonensis* apresenta ainda uma beta-esterase, denominada de est-9, presente só nos machos e uma alfa-esterase, a est-7 que ocorre só nas fêmeas. Em *D. melanogaster*, uma carboxilesterase denominada EST 6, presente no fluido seminal e encontrada





predominantemente no bulbo ejaculatório dos machos, parece estar envolvida nos processos reprodutivos desta espécie. Essa esterase não é exclusiva desse tecido, nem dos machos, e tem sido objeto de muitos estudos (Mane *et al.*, 1983; Labate *et al.*, 1990). Jones & Bancroft (1986) encontraram uma esterase em *Anthonomus grandis*, a EST 1, ativa na maioria dos ovários e corpos gordurosos analisados das fêmeas e raramente em testículos. Embora a atividade deste loco não seja ligada ao sexo, o produto deste gene parece ser influenciado pelo sexo, uma vez que ocorre quatro vezes mais em fêmeas do que em machos e é fisiologicamente importante durante o processo de produção dos ovos.

#### I.6. Origem das enzimas esterásicas

Com relação à origem das esterases, muitas dúvidas ainda existem. As esterases pertencem a um grupo ou família multigênica. Segundo Myers *et al.* (1988) a origem de famílias multigênicas por duplicação e subsequente divergência, constitui o ponto chave da teoria da evolução molecular nos eucariontes mais evoluídos. Um resultado frequentemente aceito, é que a similaridade funcional entre diferentes proteínas reflete correlações genéticas. Entretanto, é importante notarmos evidências contrárias de comparações de sequências de cinco genes esterásicos clonados, pertencentes a uma família multigênica de serino-hidrolases.

Myers *et al.* (1988) mencionam várias evidências que suportam a hipótese de que as esterases estão relacionadas filogeneticamente com as serino-proteases; compreendem, então, uma família multigênica de serino-hidrolases. Algumas características das esterases e hidrolases sustentam esta hipótese. Segundo esses autores, a evidência mais forte provém da análise de peptídeos tripticos, que contêm parte do sítio ativo isolado de várias carboxilesterases, por suas ligações com um análogo dos substratos, o diisopropil fluorofosfato (DFP). As sequências destes peptídeos compartilham um octapeptídeo de consenso que contém um resíduo de serina, envolvido diretamente na reação hidrolítica. Os sítios catalíticos de várias proteases também foram isolados e caracterizados por este método e eles também possuem esta sequência de consenso octapeptídica, invariavelmente com uma serina. Além disso, existem outras evidências que demonstram a similaridade entre as carboxilesterases e as serino-proteases: uma combinação específica (três-em-oito) entre as duas sequências de consenso,



sugerindo suas origens a partir de um ancestral comum; a inativação de ambos os tipos de enzimas pelo DFP, por ligação irreversível à serina presente no centro ativo; a inibição por inseticidas organofosforados e carbamatos, e a sobreposição de especificidade aos substratos. A clonagem e o sequenciamento de várias serino-proteases também forneceram evidências de que elas estão relacionadas filogeneticamente.

Existem semelhanças indiretamente indicadas que reforçam a hipótese de parentesco evolutivo entre estas enzimas, pois muitas serino-proteases possuem atividade esterásica e algumas colinesterases possuem um mecanismo catalítico semelhante ao das proteases (Heymann, 1980). Contudo, existem algumas conclusões contrárias encontradas por Myers *et al.* (1988), baseadas em análises comparativas entre as sequências de duas esterases acetilcolinesterases de *Torpedo californica*, uma butirilcolinesterase do homem, duas carboxilesterases do homem e a EST 6 de *Drosophila melanogaster*. A sequência de todas, exceto as duas carboxilesterases do homem, mostraram valores de similaridade altamente significativa. Os autores compararam essas quatro sequências de similaridade altamente significativa com as sequências de 4.753 proteínas de uma biblioteca (National Biomedical Research Foundation). Apenas uma proteína (uma tiroglobulina bovina) mostrou uma sequência similar à sonda derivada das quatro esterases. Nenhuma das serino-proteases estudadas mostraram similaridade significativa à sonda esterásica. Os autores concluíram que as esterases não podem ser incluídas, juntamente com as serino-proteases, na família multigênica das serino-hidrolases, mas que, respostas definitivas para explicar a evolução de funções similares em grupos diferentes de enzimas, dependem de mais estudos.

Frequentemente, é aceito que novos genes comumente se originam por duplicações de locos pré-existent e a subsequente divergência do gene duplicado. Brady & Richmond (1992) verificaram recentemente que o locus *Est-5* (*Est-5* = gene; EST 5 = proteína), de *Drosophila pseudoobscura*, reside dentro de um *cluster* de três genes intimamente ligados e altamente similares, *Est-5A*, *Est-5B*, e *Est-5C*, e podem ter evoluído a partir de um loco ancestral comum. A região cromossômica homóloga, em *Drosophila melanogaster*, contém somente dois genes, *Est-6* e *Est-P*. Collet *et al.* (1990) introduziram três genes de *Drosophila pseudoobscura*, individualmente, em *Drosophila melanogaster*, através da transformação por elementos-P e revelaram que o gene da





região central, o *Est-5B*, codifica para a proteína *EST 5*. Brady & Richmond (1992) também demonstraram que o gene *EST-5A*, como o *Est-P* em *D. melanogaster*, produz um único transcrito predominante no terceiro instar larval e que, o gene *Est-5C* parece não produzir um transcrito abundante em nenhuma fase do desenvolvimento.

Segundo estes autores, os genes esterásicos de *D. pseudoobscura* fornecem um interessante material para estudo do crescimento e da diversificação de famílias multigênicas, em virtude das altas taxas de variação intraespecífica e divergência interespecífica apresentadas pelos mesmos. A comparação das sequências entre o gene *Est-5B* de *D. pseudoobscura* e seu gene homólogo em *D. melanogaster*, o gene *Est-6*, realizada por Brady *et al.* (1990), revelaram similaridades na divergência interespecífica de *Est-5B* e *Est-6*, relativa a um polimorfismo intraespecífico para o locus *Est-6*. Posteriormente, Brady e Richmond utilizaram estes dados para propor uma possível história evolutiva destes locos em *D. melanogaster* e *D. pseudoobscura*.

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





ocorrido pouco antes das espécies divergirem, seguida pela perda do gene *Est-5C* em *D. melanogaster*.

Embora Brady & Richmond (1992) tenham proposto um possível modelo evolutivo para a origem das duplicações gênicas do locus *Est-5/Est-6* nestas duas espécies de *Drosophila*, muitas perguntas devem ainda ser respondidas. Finalmente, os mesmos autores salientam o importante papel das substituições de nucleotídeos nos cinco genes esterásicos estudados e o papel da seleção natural na modelagem dos padrões de variação para o loco *Est-5/Est-6* em *D. pseudoobscura* e *D. melanogaster*.

Um exemplo da origem de novos genes esterásicos por duplicação gênica é a aquisição de resistência aos inseticidas, mencionada anteriormente. Segundo Devonshire & Sawicki (1979) as duplicações de genes estruturais são pré-requisito para a evolução, porque elas impedem a ocorrência de mutações em cópias redundantes, preservando o gene parental vantajoso. Evidências para este fenômeno são derivadas de estudos de proteínas com estruturas intimamente relacionadas, mas que apresentam papéis diferentes no metabolismo. O primeiro estágio do processo, duplicação sem mutação subsequente, leva à produção de maior quantidade do produto gênico. Isto é vantajoso durante o desenvolvimento, quando grandes quantidades dos diferentes tipos de RNA são requeridas. Entretanto, exemplos da ocorrência destes mecanismos causadores do aumento da produção de proteínas específicas, em resposta à modificações das condições ambientais, são provenientes de estudos em bactérias, leveduras e culturas de células eucariontes. Utilizando linhagens inseticida-resistentes de *Myzus persicae*, aqueles autores obtiveram uma correlação entre a resistência e a quantidade total de atividade das carboxilesterases e verificaram que, o aumento da atividade esterásica se origina principalmente por modificações em uma única enzima, a E4. Este aumento pode ser melhor explicado pela presença de maiores quantidades da E4, do que por maior atividade de enzimas mutantes, como mostraram as medidas de atividade do centro ativo de diferentes variantes enzimáticas. Sete variantes para essa enzima foram detectadas por eletroforese. Estes dados sugerem a ocorrência de duplicação gênica, originando novos genes esterásicos que, por sua vez, conferem vantagens seletivas ao organismo em condições ambientais adversas. Estes afídios são bem adaptados ao seu ambiente, pois possuem a habilidade de duplicar o gene que codifica para a esterase E4 (até 64





cópias deste gene foram verificadas em linhagens resistentes de *Myzus persicae*), sobrevivendo ao tratamento com inseticidas, e anulando a produção excessiva da enzima na ausência destes compostos.

## II.1. Obtenção das Amostras

### I.7. Objetivos

No presente trabalho foi realizado o estudo do padrão de esterases em fêmeas e machos adultos de *Haematobia irritans* (mosca-do-chifre), utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, procurando contribuir, desta forma, para o conhecimento da biologia deste importante ectoparasita do gado.

O desenvolvimento deste estudo permitiu-nos:

1. o conhecimento do padrão de esterases característico da espécie;
2. a verificação de diferenças, quanto a esses padrões, entre machos e fêmeas das populações analisadas;
3. o conhecimento da variabilidade intrapopulação e interpopulação;
4. algumas observações quanto aos fatores relacionados com a aquisição de resistência nas populações desta espécie, bem como, relacioná-las com bandas esterásicas, produtos de genes que possam estar envolvidos neste fenômeno;
5. o conhecimento do comportamento destas enzimas, na presença de alguns inibidores, visando à sua classificação.





## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### II.1. Obtenção das Amostras

As amostras de *Haematobia irritans* analisadas no presente trabalho foram coletadas em diferentes localidades, que são mostradas na Tabela I e Figura 1. Nos quatro casos, as moscas foram coletadas em fazendas, sendo que o tempo decorrido da última aplicação de inseticida e o tipo de inseticida utilizado encontram-se na mesma tabela. Em Nova Aliança, SP, foram realizadas duas coletas (Fazenda Santa Luzia, de propriedade do senhor Antônio Azeredo Pontes), cujo tempo decorrido após a última aplicação de inseticida, até a data da coleta, foi de 30 e 45 dias, e os inseticidas aplicados por pulverização foram Butox e Triatox. Em Paranaíba, MS, até a data da coleta (realizada na Fazenda União das Índias), não havia sido utilizada pulverização para extermínio das moscas, que eram de introdução recente nesta fazenda. Com relação à amostra proveniente de Birigui, SP, o tempo decorrido entre a última aplicação de inseticida e a data da coleta foi de 60 dias (coleta realizada na Fazenda Santa Inês, de propriedade do senhor José João Jorge) e o inseticida utilizado por pulverização foi o cypermetrim. Na fazenda de Cassilândia, MS (Fazenda Canto da Seriema, de propriedade do senhor Adolar Ruiz Garcia), decorreram 70 dias entre a última aplicação e a coleta, e o inseticida aplicado por pulverização também foi o cypermetrim.

Para obtenção de machos e fêmeas adultos, utilizou-se um puçá feito com tecido de nylon, em forma de funil, tendo na base um reforço em forma tubular, fechado no fundo. As moscas eram coletadas movendo-se o puçá, rapidamente para a direita e para a esquerda, sobre o gado imobilizado em um brete de contenção, e em seguida, fechando-se o mesmo com uma das mãos na região imediatamente acima da parte tubular reforçada. Após a coleta, as moscas eram cuidadosamente transferidas para vidros de 1/4 de litro ou pequenos tubos de vidro. Estas sobreviviam em laboratório nos mesmos frascos, por um ou dois dias, provavelmente em função da última refeição de sangue. Neste período, as mesmas eram separadas por sexo e congeladas a -20°C para posterior análise.





**TABELA I.** Procedência das amostras de *Haematobia irritans* analisadas no presente trabalho, número de moscas estudadas e dados sobre o uso de inseticidas.

| <b>Amostra</b>     | <b>Procedência</b> | <b>Nº de indivíduos analisados</b> | <b>Data da última aplicação de inseticida antes da coleta</b> | <b>Tipo de inseticida</b> |
|--------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <b>População 1</b> | Nova Aliança-SP    | 185                                | 30 e 45 dias                                                  | Butox e Triatox           |
| <b>População 2</b> | Paranaíba-MS       | 40                                 | sem pulverização anterior                                     | -                         |
| <b>População 3</b> | Birigui-SP         | 170                                | 60 dias                                                       | Cypermtrim                |
| <b>População 4</b> | Cassilândia-MS     | 260                                | 70 dias                                                       | Cypermtrim                |

**Figura 1.** Localização dos pontos de coleta das amostras de *Haematobia irritans* analisadas no presente trabalho.



## II.2. Preparo dos Géis

Neste trabalho foi utilizado o gel de acrilamida formado por uma reação



**Figura 1.** Localização dos pontos de coleta das amostras de *Haematobia irritans* analisadas no presente trabalho.

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Tampão de corrida         | 6,25 ml |
| Solução de acrilamida 10% | 2,00 ml |
| Peróxido de amônio a 20%  | 0,40 ml |
| TEMED                     | 25 µl   |
| Água q. s. p.             | 25 ml   |

Após o preparo, os géis foram polimerizados entre duas placas de vidro de

19X17X0,5 cm, preso por garras e mantido sob vácuo entre si de um milímetro de espessura.



## II.2. Preparo dos Géis

Neste trabalho foi utilizado o gel de poliacrilamida, formado por uma reação de polimerização entre a acrilamida e seu comonômero de ligação cruzada, a bis-acrilamida (N,N', metileno-bis-acrilamida), transformando-se em uma espécie de "malha" por onde, as proteínas podem ser separadas. Uma variação no tamanho dos poros existentes nesta malha pode ser obtida, modificando-se a proporção acrilamida/bis-acrilamida que determina a porcentagem de ligações cruzadas ou variando-se a concentração do gel. Os géis foram preparados nas concentrações de 10%, que apresentou melhores resultados comparativamente às concentrações de 5 e 7 %, em testes previamente realizado por Ceron (dados não publicados).

As soluções e tampões que foram empregados no presente estudo foram adaptadas dos trabalhos de Davis (1964) e Laemli (1970), descritos a seguir:

- Solução estoque de acrilamida/bis-acrilamida, preparada com 30g de acrilamida e 0,8g de bisacrilamida dissolvidas em água em um volume final de 100ml.
- Tampão do gel (4X concentrado) obtido com tris a 1,5 M ajustado a pH 8,8 com HCl 6M.
- Solução de persulfato de amônio a 2% (recém preparada).
- TEMED (N, N, N, N, tetrametilenodiamina) com aproximadamente 99% de pureza, este deve ser o último componente adicionado a solução, dando início a polimerização

Os volumes de água e demais componentes utilizados para o preparo de 25 ml da solução do gel são os seguintes:

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Tampão do gel (4X) pH 8,8..... | 6,25 ml |
| Solução de acrilamida/bis..... | 8,00 ml |
| Persulfato de amônio a 2%..... | 0,40 ml |
| TEMED.....                     | 25µl    |
| Água q. s. p.....              | 25 ml   |

Após o preparo, os géis foram polimerizados entre duas placas de vidro de 15X17X0,5 cm, presas por garras e mantendo um espaço entre si de um milímetro de espessura,





obtido pela introdução de espaçadores de acrílico. A vedação foi feita com uma fina camada de vaselina entre os espaçadores e as placas. Uma das placas apresentava um recorte com dois centímetros de profundidade, no qual foi adaptado o pente acrílico, com 15 ou 20 dentes, formando poços para a aplicação das amostras. O espaço entre as placas era então preenchido com a solução de polimerização. Após 30 minutos, tempo necessário para a polimerização, o pente e o espaçador de acrílico inferior eram retirados e as placas dispostas na cuba, em posição vertical. O modelo da cuba possibilitava a adaptação de dois conjuntos de placas ao mesmo tempo, permitindo a análise simultânea de 30 ou 40 amostras, dependendo do pente de acrílico utilizado no preparo dos géis.

### II.3. Preparo das Amostras para a Realização da Eletroforese

As moscas foram individualmente maceradas a 0° C em 35 µl do tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M, pH 8,8 contendo glicerol a 10%) e, em seguida, centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos. Para cada amostra, utilizou-se um volume de 10 µl do sobrenadante para eletroforese. Após a aplicação das amostras, os géis foram submetidos à eletroforese por 3 horas e 30 minutos, a uma voltagem constante de 200V. Os compartimentos superior e inferior da cuba foram preenchidos com tampão Tris-glicina 0,1M pH 8,3.

### II.4. Identificação das Esterases

Após a eletroforese, as esterases foram identificadas nos géis, utilizando-se o método de Ceron (1988), que consiste em uma pré-incubação do gel por 60 minutos, à temperatura ambiente, em 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,2, seguida da reação de coloração por mais 60 minutos, à temperatura ambiente, na ausência de luz, com uma solução recém-preparada e filtrada, contendo 30 mg de β-naftil acetato, 60 mg de α-naftil acetato (solubilizados em 1 ml de acetona ou metanol), 120 mg de Fast Blue RR salt e 10 ml de n-propanol, dissolvidos em 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2. O teste permite a visualização da atividade de alfa e beta esterases, nos géis, como bandas de coloração preta e vermelha, indicando, respectivamente, a hidrólise preferencial do α ou β-naftil acetato. Após a coloração, os géis foram tratados com 100 ml





de uma solução descorante, por 24 horas. Em seguida, os mesmos foram mantidos em uma solução conservante até o momento da secagem.

Em alguns experimentos foram testadas concentrações diferentes de  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetatos para verificar a atividade diferencial das esterases de *Haematobia irritans* frente a estes substratos. As mesmas amostras foram submetidas à coloração com uma solução contendo apenas o  $\alpha$ -naftil acetato (45 mg), ou o  $\beta$ -naftil acetato (45 mg) ou ainda, misturas contendo ambos substratos (30 mg de  $\alpha$  e 15 mg de  $\beta$ -naftil acetato ou 15 mg de  $\alpha$  e 30 mg de  $\beta$ -naftil acetato). Os demais procedimentos foram os mesmos já descritos.

Também foram testados procedimentos de coloração das esterases em diferentes pHs a fim de se detectar possíveis bandas que não estivessem sendo coradas nos testes usuais em pH 6,2. As mesmas amostras foram pré-incubadas por duas horas e, posteriormente, incubadas com a solução de coloração para esterases, em tampões de pHs 4,0; 5,0; 6,2 (usual) e 8,0. Os tampões utilizados foram acetato de sódio (pHs 4,0 e 5,0) e fosfato de sódio para os demais pHs, porém, todos na concentração 0,1 M.

## II.5. Secagem dos Géis

A secagem dos géis seguiu o método de Ceron *et al.* (1992). Os géis foram banhados em solução de gelatina comercial a 5%, prensados em um bastidor entre duas folhas de papel celofane e deixados à temperatura ambiente por três ou quatro dias para secagem. Por este procedimento, os géis desidratam, transformando-se em uma fina película entre as folhas de celofane. Estas devem então ser recortadas e guardadas para futuras análises.

## II.6. Testes com Inibidores

Para a realização destes testes, foram utilizados nove inibidores: malathion, fluoreto de fenilmetilsulfonila, sulfato de cobre, Triton X-100, ácido iodoacético, fluoreto de sódio, sulfato de eserina, p-cloromercuribenzoato e o beta-mercaptoetanol.

Nestes testes, o procedimento normal para a realização da eletroforese foi o já estabelecido, com exceção da adição dos inibidores na pré-incubação e na solução de coloração.





#### A. Malathion

Neste experimento, fêmeas e machos foram analisados em géis separados. Para cada gel, foram utilizadas amostras resultantes do processo de maceração de duas moscas adultas em tampão de amostra. Essas amostras foram aplicadas de forma repetida nos géis, sendo que, após a eletroforese, parte do gel foi pré-incubado e corado seguindo-se o procedimento usual e a outra parte, na presença do malathion 0,4 mM. Em alguns experimentos, este inibidor foi dissolvido diretamente no tampão de pré-incubação e na solução corante. Em outros, foi feita uma pré-diluição do malathion em óleo mineral e em seguida, adicionado ao tampão ou à solução corante.

#### B. Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF)

Neste experimento, fêmeas e machos foram analisados no mesmo gel. Foram preparados dois géis, sendo que as mesmas amostras, resultantes da maceração de duas moscas em tampão de amostra, foram repetidas em ambos os géis.

Após a eletroforese, uma metade do gel, designada controle, foi submetida aos processos de pré-incubação e coloração normais. As outras três partes foram submetidas, separadamente, a três inibidores diferentes: fluoreto de fenilmetilsulfonila, sulfato de cobre e o detergente Triton X-100. Os experimentos utilizando os dois últimos inibidores estão descritos nos próximos itens.

No caso do PMSF, este composto foi acrescentado nas etapas de pré-incubação e coloração, na concentração final de 1 mM, sendo que o mesmo foi previamente diluído em 1 ml de metanol.

#### C. Sulfato de cobre

As mesmas amostras obtidas no item anterior foram testadas com o sulfato de cobre. Este composto foi dissolvido em água e acrescentado ao tampão de pré-incubação e à solução corante, na concentração final de 1 mM.

#### H. Beta-mercaptoetanol

As amostras utilizadas neste experimento também foram descritas no item B.





#### D. Triton X-100

As amostras utilizadas, neste experimento, foram obtidas conforme descrito no item B.

Da mesma forma que nos experimentos anteriores, o Triton X-100 foi utilizado no processo de pré-incubação e de coloração, na concentração final de 1%.

#### E. Ácido iodoacético

Neste experimento, fêmeas e machos foram analisados no mesmo gel. Em cada gel foram aplicadas amostras resultantes do processo de maceração de 8 moscas em tampão de amostra. As mesmas foram aplicadas de forma repetida em géis diferentes e, após a eletroforese, parte do gel foi submetida aos processos de pré-incubação e coloração usuais e as demais, na presença dos inibidores, que estão relacionados a seguir.

O ácido iodoacético foi dissolvido diretamente no tampão utilizado na pré-incubação e na solução corante, na concentração final de 1 mM.

#### F. Fluoreto de sódio

As amostras utilizadas neste experimento são as mesmas descritas no item anterior.

O fluoreto de sódio foi dissolvido no tampão utilizado na pré-incubação e na solução corante. A concentração final deste composto nas duas soluções utilizadas foi de 5mM.

#### G. Sulfato de eserina

As amostras utilizadas neste experimento foram as mesmas descritas no item E.

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

#### H. Beta-mercaptoetanol

As amostras utilizadas neste experimento também foram descritas no item E.





### III. RESULTADOS

A solução pré-incubadora foi preparada acrescentando-se o beta-mercaptoetanol ao tampão utilizado nesta etapa e na solução corante. Este composto foi utilizado em duas concentrações: 0,1 mM e 10 mM.

#### I. p-Cloromercuribenzoato (pCMB)

Neste experimento, cada amostra analisada foi resultante da maceração de duas moscas no tampão de amostra e, como nos experimentos anteriores, foram aplicadas no gel de forma repetida.

Após a eletroforese, uma parte do gel foi submetida aos processos usuais de pré-incubação e coloração, e a outra, na presença do pCMB. A concentração final deste composto nas soluções utilizadas foi de 0,01 mM.

#### II.7. Análise estatística

Para a comparação das populações analisadas quanto às frequências dos padrões de bandas, foi utilizado o Teste de  $X^2$ .





### III. RESULTADOS

#### III.1. O padrão de bandas esterásicas e sua variação nas populações analisadas

Os resultados obtidos neste estudo, referem-se à análise de 655 indivíduos, sendo 40 de Paranaíba, 185 de Nova Aliança, 170 de Birigui e 260 de Cassilândia. Foram observadas 8 bandas esterásicas no total, nas populações analisadas. Essas bandas foram denominadas EST 1 a EST 8, a partir da extremidade anódica do gel.

Na figura 2 temos uma representação dos padrões de bandas esterásicas de *Haematobia irritans*, encontrados nas quatro populações analisadas. Esses padrões foram determinados por uma análise comparativa entre as populações, isto é, as bandas presentes em uma população foram numeradas em relação à posição das bandas de outra população. Para este estudo comparativo, amostras das populações foram analisadas num mesmo gel (com exceção das de Paranaíba) procurando, assim, evitar erros devidos a diferenças na velocidade de migração que podem ocorrer em eletroforeses realizadas separadamente. Géis comparativos são apresentados nas figuras 3 e 4.

Quando os géis das quatro populações de *Haematobia irritans* foram submetidos à coloração com o  $\alpha$ -naftil e o  $\beta$ -naftil acetatos, simultaneamente, coraram-se apenas pelo  $\alpha$ -naftil. Na ausência deste, porém, coraram-se com o  $\beta$ -naftil. O  $\alpha$  e o  $\beta$ -naftil acetatos funcionam como substratos para enzimas esterásicas. Em razão deste comportamento perante os dois substratos, as bandas esterásicas de *Haematobia irritans* foram denominadas bandas  $\alpha$ .

Nas figuras 5 a 8 são apresentadas as bandas com as colorações resultantes da utilização de soluções contendo os substratos isolados e juntos em diferentes concentrações. Nas amostras coradas apenas com o  $\alpha$ -naftil (Figura 5), todas as bandas presentes no gel apresentaram tons de cinza claro a preto. Na figura 6, as mesmas amostras foram tratadas somente com o  $\beta$ -naftil e todas as bandas apresentaram tons de vermelho claro a vermelho escuro.

As figuras 7 e 8 mostram as bandas resultantes do uso dos dois substratos juntos e em proporções diferentes: na figura 7, foram utilizados  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil na proporção de 2:1 e na figura 8, de



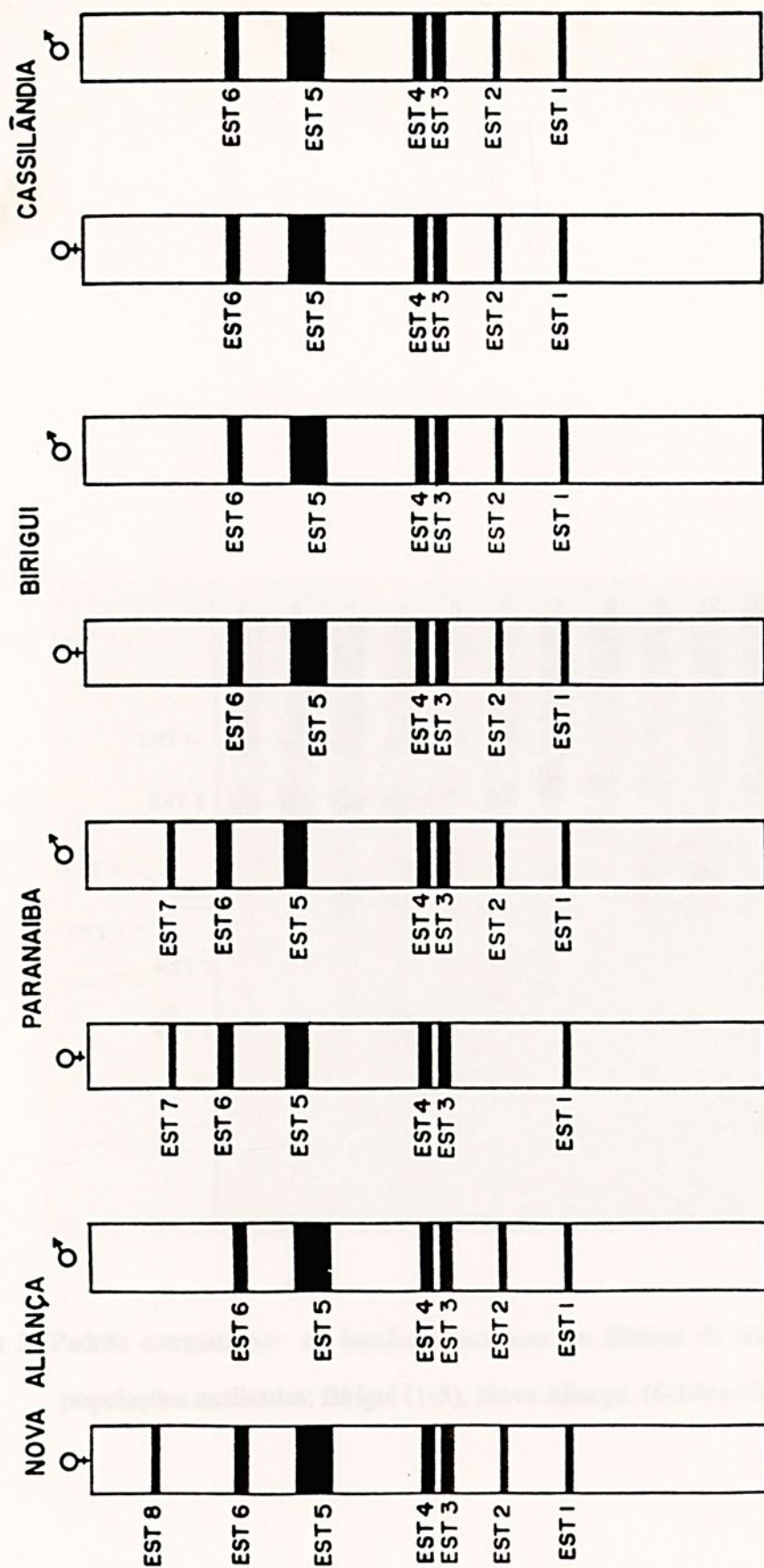
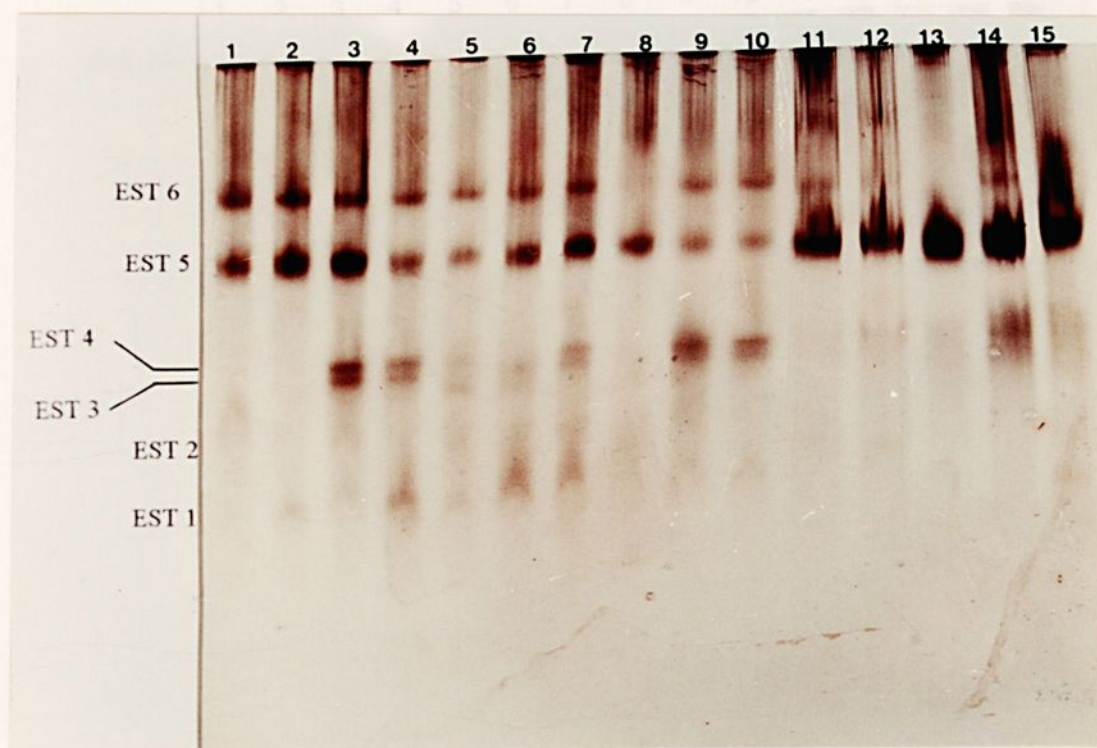


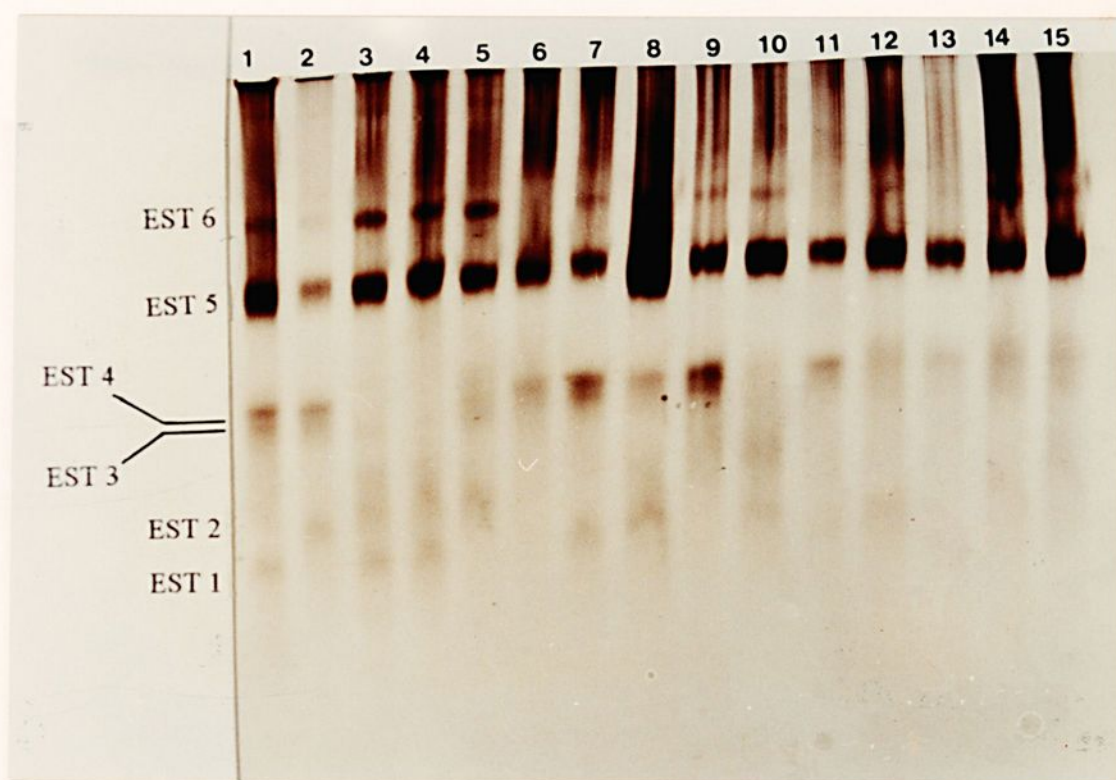
FIGURA 2 - Bandas esterásicas (EST 1 a EST 8) detectadas em fêmeas e machos de Haematobia irritans nas quatro populações analisadas.



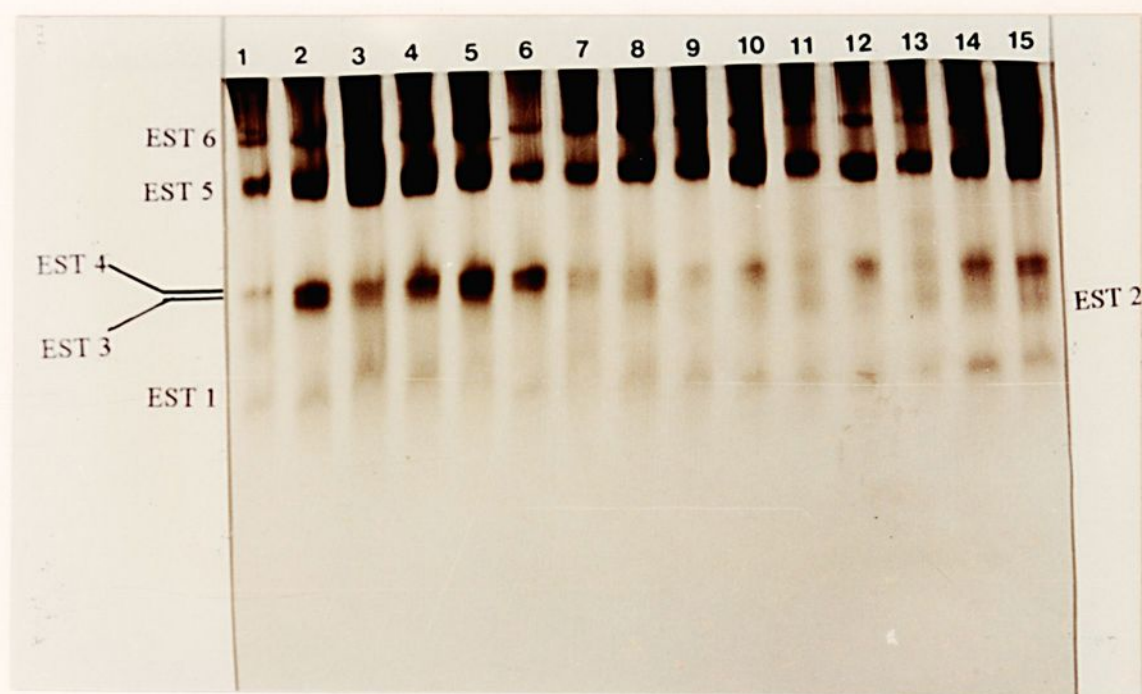


**Figura 3.** Padrão comparativo de bandas esterásicas em fêmeas de *Haematobia irritans* de três populações analisadas: Birigui (1-5), Nova Aliança (6-10) e Cassilândia (11-15).



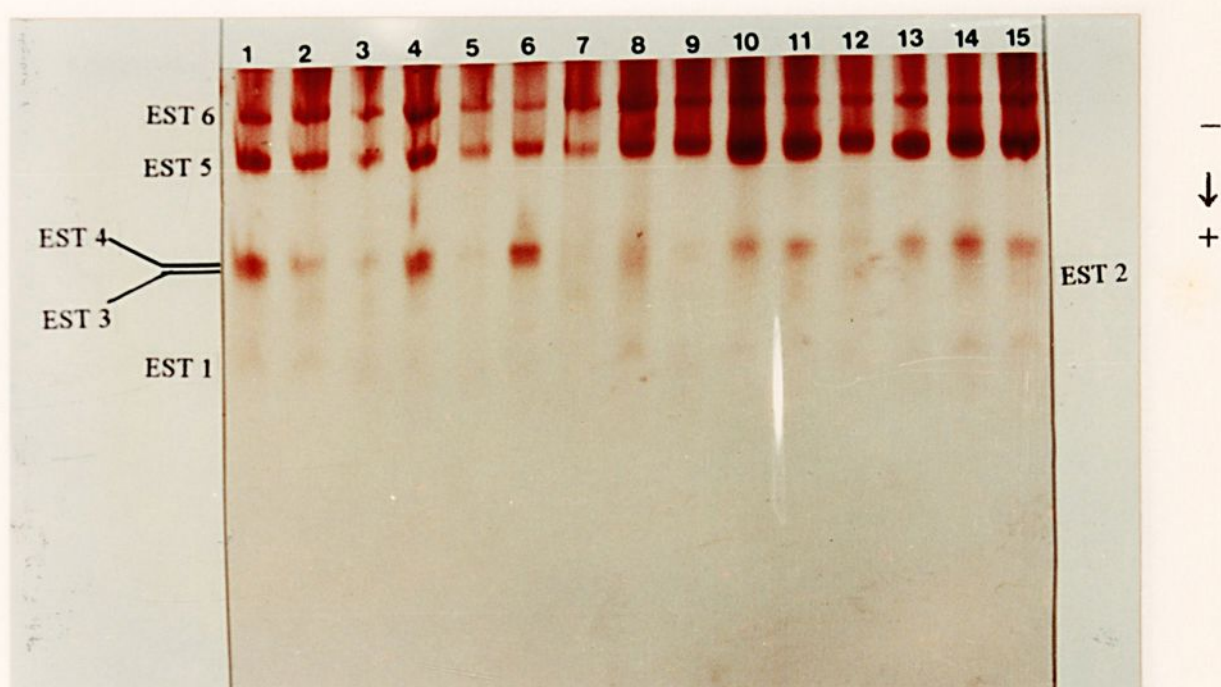


**Figura 4.** Padrão comparativo de bandas esterásicas em machos de *Haematobia irritans* de três populações analisadas: Birigui (1-5), Nova Aliança (6-10) e Cassilândia (11-15).

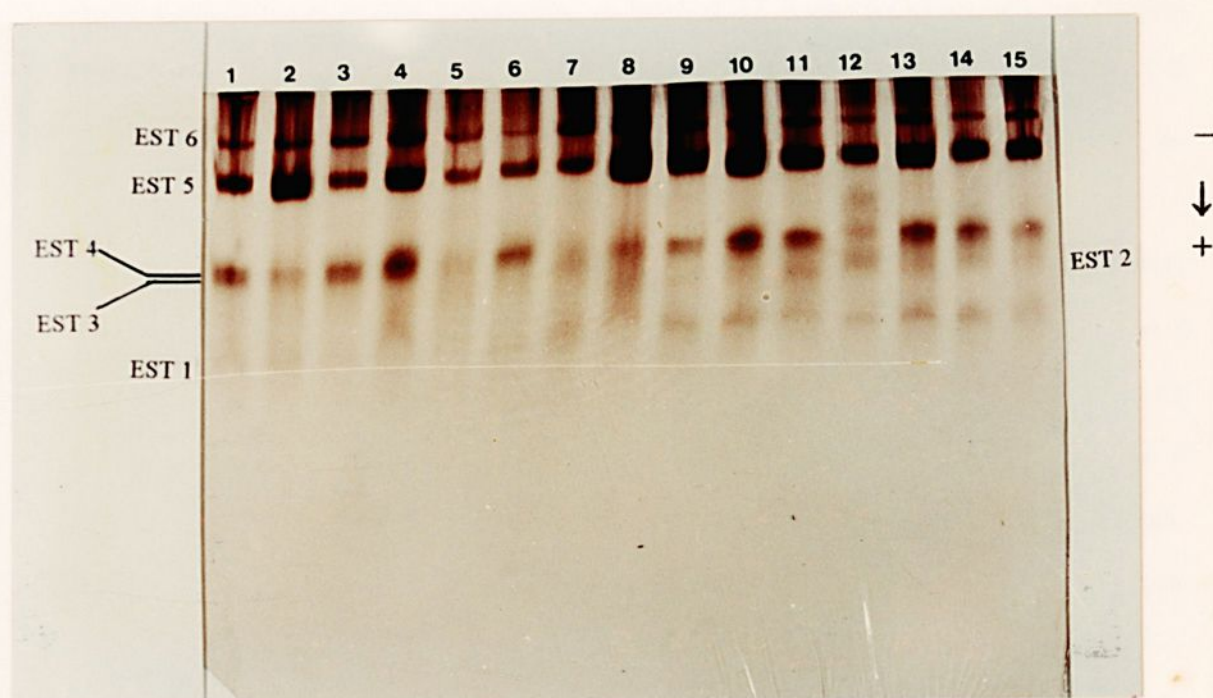


**Figura 5.** Padrão de bandas esterásicas de *Haematobia irritans* coradas com uma solução contendo 45 mg de  $\alpha$ -naftil acetato, (1-8)= fêmeas e (9-15)= machos.





**Figura 6.** Padrão de bandas esterásicas de *Haematobia irritans* coradas com uma solução contendo 45 mg de  $\beta$ -naftil acetato, (1-8)= fêmeas e (9-15)= machos.



**Figura 7.** Padrão de bandas esterásicas de *Haematobia irritans* coradas com uma solução contendo 30 mg de  $\alpha$ -naftil acetato e 15 mg de  $\beta$ -naftil acetato, (1-8)= fêmeas e (9-15)= machos.



1:2. Algumas bandas coraram-se mais intensamente no gel em que o  $\alpha$ -naftil se encontrava em maior quantidade (figura 7).

Com relação ao pH, as esterases de *Haematobia irritans* coraram-se com mais evidência em pH 6,2, utilizando-se o  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetatos como substratos. Nos pHs 4,0 e 5,0 praticamente não houve detecção das bandas esterásicas. Em pH 8,0 o gel mostrou-se intensamente borrado, impedindo a visualização das bandas, provavelmente devido a hidrólise não-enzimática dos substratos.

As quatro populações analisadas mostraram poucas diferenças qualitativas quanto às bandas (Figuras 2 e 9). A banda EST 2 não foi observada nas fêmeas analisadas de Paranaíba, mas ocorreu em fêmeas e machos das demais populações. A banda EST 7 não foi observada em Birigui, Castilho e São João do Rio Preto.

foi detectada em todas as populações analisadas. A banda EST 8 foi detectada em todas as populações analisadas, exceto em São João do Rio Preto.

de cada população analisada. A banda EST 9 foi detectada em todas as populações analisadas, exceto em São João do Rio Preto.

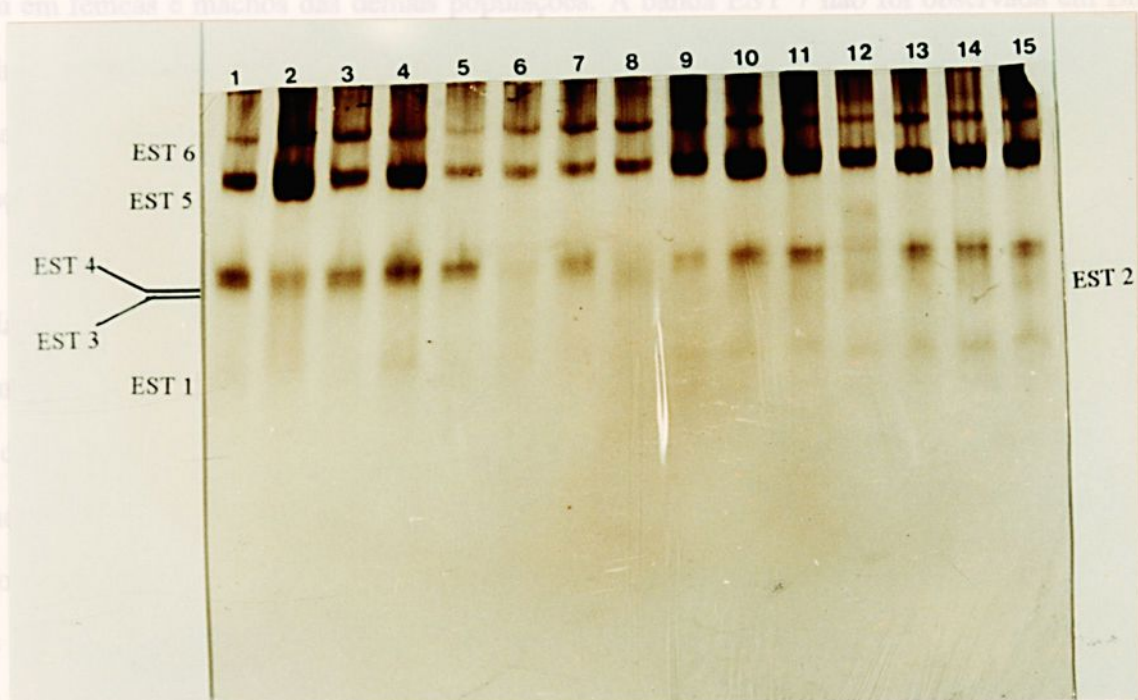
atividade enzimática. A banda EST 10 foi detectada em todas as populações analisadas, exceto em São João do Rio Preto.

geralmente mais intensa. A banda EST 11 foi detectada em todas as populações analisadas, exceto em São João do Rio Preto.

quando analisadas. A banda EST 12 foi detectada em todas as populações analisadas, exceto em São João do Rio Preto.

menor intensidade. A banda EST 13 foi detectada em todas as populações analisadas, exceto em São João do Rio Preto.

EST 14 foi detectada em todas as populações analisadas, exceto em São João do Rio Preto.



**Figura 8.** Padrão de bandas esterásicas de *Haematobia irritans* coradas com uma solução contendo 15 mg de  $\alpha$ -naftil acetato e 30 mg de  $\beta$ -naftil acetato, (1-8)= fêmeas e (9-15)= machos.

1:2. Algumas bandas coraram-se mais intensamente no gel em que o  $\alpha$ -naftil se encontrava em maior quantidade (figura 7).

Com relação ao pH, as esterases de *Haematobia irritans* coraram-se com mais evidência em pH 6,2, utilizando-se o  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetatos como substratos. Nos pHs 4,0 e 5,0 praticamente não houve detecção das bandas esterásicas. Em pH 8,0 o gel mostrou-se intensamente borrado, impedindo a visualização das bandas, provavelmente devido a hidrólise não-enzimática dos substratos.

As quatro populações analisadas mostraram poucas diferenças qualitativas quanto às bandas (Figuras 2 e 9). A banda EST 2 não foi observada nas fêmeas analisadas de Paranaíba, mas ocorreu em fêmeas e machos das demais populações. A banda EST 7 não foi observada em Birigui, Cassilândia e Nova Aliança, porém foi detectada em fêmeas e machos de Paranaíba. A banda EST 8 foi detectada apenas em fêmeas de Nova Aliança. As demais bandas foram detectadas em todas as populações.

As figuras 10 a 13 mostram algumas fotografias de géis contendo padrões de bandas de cada população estudada. Essas figuras mostram que as oito bandas diferiram entre si quanto à espessura e a intensidade de coloração. Essa variação é entendida como diferenças no grau de atividade enzimática. Entre as bandas esterásicas de *Haematobia irritans*, a de maior espessura e geralmente de coloração mais intensa, é a EST 5, seguida pelas bandas EST 6, EST 4 e EST 3, que, quando comparadas com a EST 5, são menos espessas e muitas vezes coram-se menos. As bandas menos coradas e, conseqüentemente, de visualização mais difícil, são as EST 1, EST 2, EST 7 e EST 8. Esta última é a mais delgada. A banda EST 5, nos indivíduos de Paranaíba, é geralmente mais delgada e menos corada do que nos indivíduos das outras populações analisadas.

Também foram verificadas variações de espessura e coloração para uma mesma banda, em diferentes indivíduos de uma mesma população. As bandas EST 5 e EST 6 apresentaram essa variação entre indivíduos, nas quatro populações analisadas, podendo, inclusive, estar ausentes em alguns indivíduos.

A banda EST 3 localiza-se, no gel, muito próxima à banda EST 4 e só foi observada junto com esta, em todas as populações analisadas. O mesmo não ocorreu com a banda EST 4, a qual

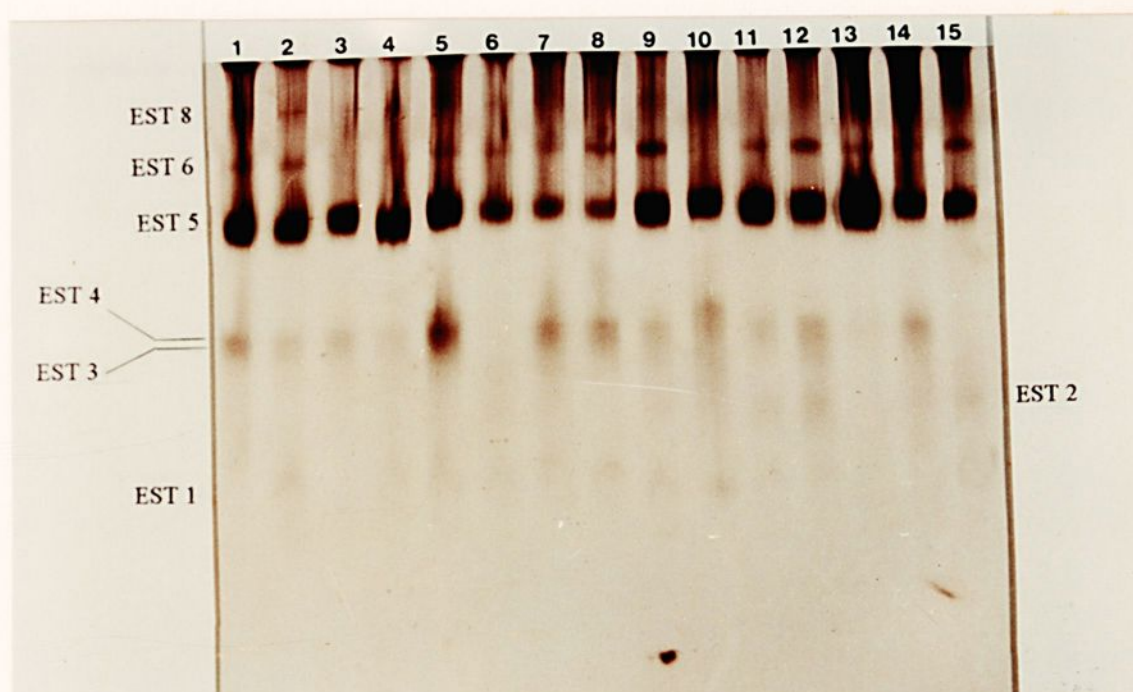




**Populações analisadas**

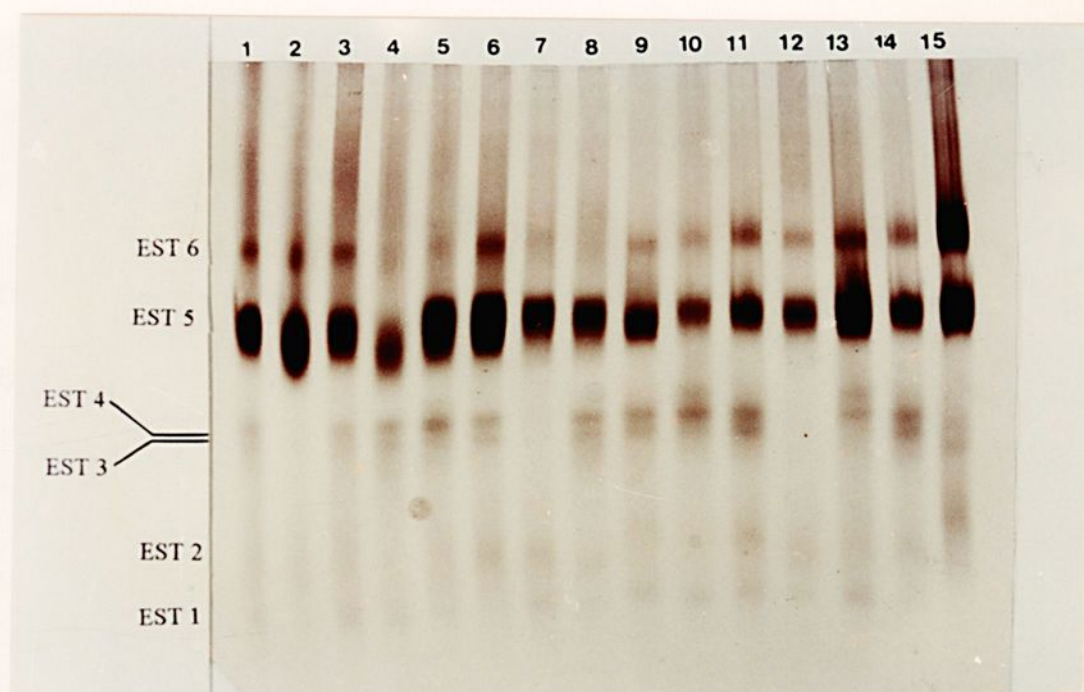
| Bandas | Nova Aliança |       | Birigui |       | Cassilândia |       | Paranaíba |       |
|--------|--------------|-------|---------|-------|-------------|-------|-----------|-------|
|        | F            | M     | F       | M     | F           | M     | F         | M     |
| EST 1  | _____        | _____ | _____   | _____ | _____       | _____ | _____     | _____ |
| EST 2  | _____        | _____ | _____   | _____ | _____       | _____ |           | _____ |
| EST 3  | _____        | _____ | _____   | _____ | _____       | _____ | _____     | _____ |
| EST 4  | _____        | _____ | _____   | _____ | _____       | _____ | _____     | _____ |
| EST 5  | _____        | _____ | _____   | _____ | _____       | _____ | _____     | _____ |
| EST 6  | _____        | _____ | _____   | _____ | _____       | _____ | _____     | _____ |
| EST 7  |              |       |         |       |             |       | _____     | _____ |
| EST 8  | _____        |       |         |       |             |       |           |       |

**Figura 9.** Distribuição das 8 bandas esterásicas encontradas nas populações analisadas de *Haematobia irritans*.

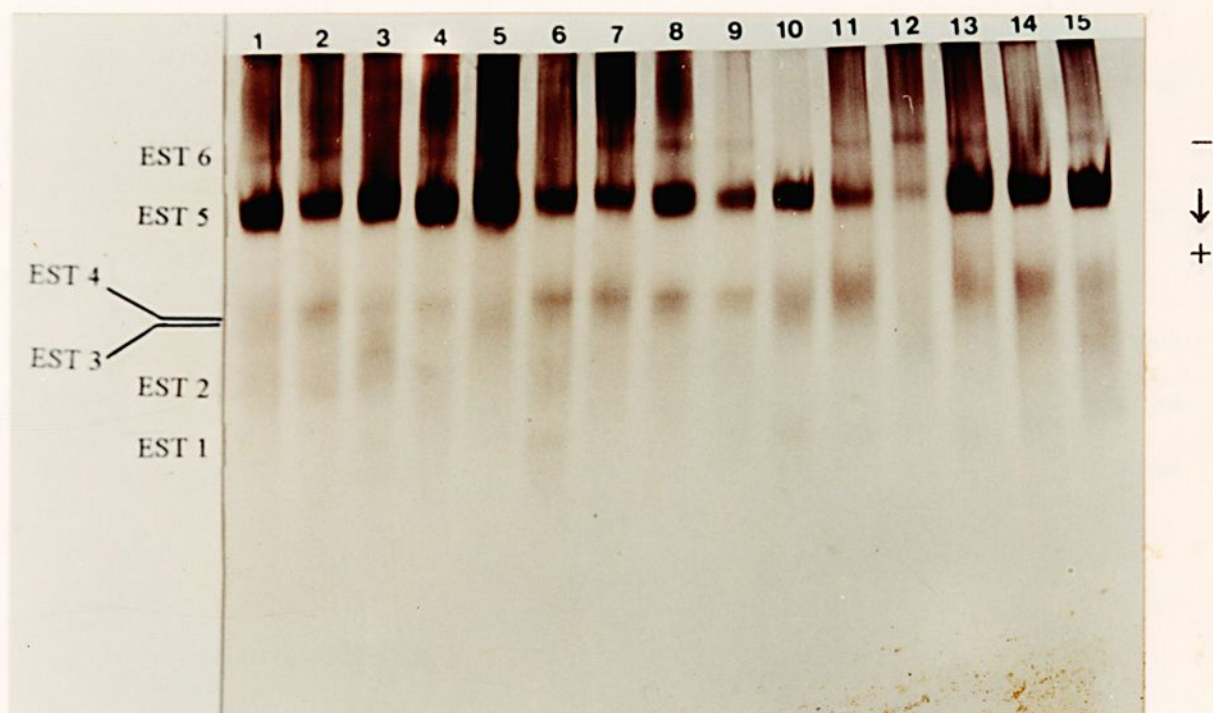


**Figura 10.** Padrão de bandas esterásicas de fêmeas (1-8) e machos (9-15) adultos de *Haematobia irritans*, coletadas em Nova Aliança, SP.





**Figura 11.** Padrão de bandas esterásicas de machos (1-8) e fêmeas (9-15) adultos de *Haematobia irritans*, coletadas em Birigui, SP.



**Figura 12.** Padrão de bandas esterásicas de fêmeas (1-8) e machos (9-15) adultos de *Haematobia irritans*, coletadas em Cassilândia, MS.

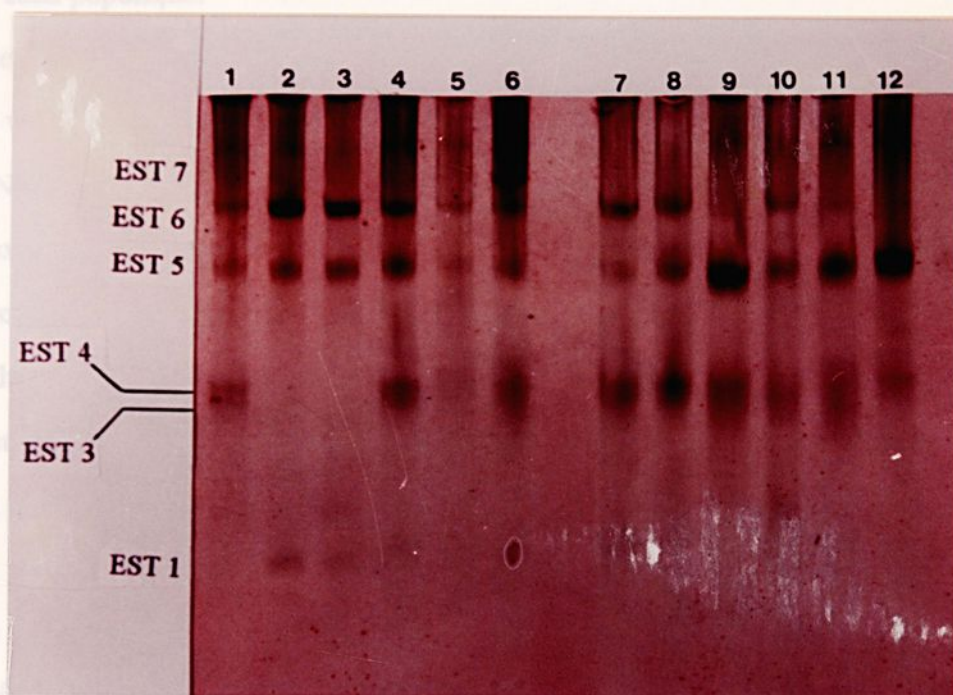


foi detectada, isoladamente, em parte da amostra analisada. Ambos apresentaram variações de espessura e intensidade de coloração entre os indivíduos analisados.

Por fim, também foram observadas variações de coloração para as bandas EST 2 e EST 1, entre os indivíduos analisados nas quatro populações. Não observamos uma nítida diferença de espessura destas bandas entre os indivíduos, porque, como já foi dito, elas são muito claras e, assim, difíceis de ser visualizadas nos géis.

Dados quanto à frequência das bandas, nas quatro populações, constam da Tabela II.

A banda EST 5 foi a que apresentou as mais altas frequências nas quatro populações, estando presente em 98% a 100% dos indivíduos analisados, apresentando as mesmas frequências em ambos os sexos, em cada população.



**Figura 13.** Padrão de bandas esterásicas de machos (1-6) e fêmeas (7-12) adultos de *Haematobia irritans*, coletadas em Paranaíba, MS.

foi detectada, isoladamente, em parte da amostra analisada. Ambas apresentaram variações de espessura e intensidade de coloração entre os indivíduos analisados.

Por fim, também foram observadas variações de coloração para as bandas EST 2 e EST 1, entre os indivíduos analisados nas quatro populações. Não observamos uma nítida diferença de espessura destas bandas entre os indivíduos, porque, como já foi dito, elas são muito claras e, assim, difíceis de ser visualizadas nos géis.

Dados quanto à frequência das bandas, nas quatro populações, constam da Tabela II.

A banda EST 5 foi a que apresentou as mais altas frequências nas quatro populações, estando presente em 98% a 100% dos indivíduos analisados, apresentando as mesmas frequências em ambos os sexos, em cada população.

As demais bandas apresentaram variação de frequência, maior ou menor, entre as populações e muitas vezes, entre os sexos.

Em Nova Aliança, também apareceram com frequências acima de 70% e pequena diferença entre os sexos, as bandas EST 6 e EST 4.

A esterase EST 6 foi também bastante frequente em Birigui (acima de 70%), com uma diferença entre machos e fêmeas de 10%. Por sua vez, a esterase EST 4 apresentou também uma frequência elevada em Paranaíba, exibindo entretanto, uma diferença bastante acentuada entre fêmeas e machos (diferença de 30%).

Com frequências ao nível de 60% e com diferença entre os sexos variando de 10% a 32%, apareceram as esterases EST 6 e EST 3 em Paranaíba e EST 4 e EST 1 em Birigui.

Ao nível de 50%, encontramos as bandas EST 4 em Cassilândia e EST 3 e EST 1 em Nova Aliança, com diferenças entre os sexos, respectivamente, de 7%, 2%, e 10%.

Ao nível de 40%, encontramos as bandas EST 3 e EST 2 em Birigui e EST 2 em Nova Aliança, diferindo, respectivamente, entre os sexos nas frequências de 12%, 12% e 8%.

Ao nível de 30%, encontramos as bandas EST 6 e EST 3 em Cassilândia, com diferença entre os sexos de 5% para a EST 3.

Ao nível de 15% a 25%, encontramos EST 1 e EST 2 em Cassilândia (respectivamente 5% e 1% de diferença entre os sexos) e EST 1 e EST 7 em Paranaíba (com diferença entre os sexos





de 5% e 10%, respectivamente).

Dois bandos foram encontradas exclusivamente em um dos sexos: a banda EST 8 em Nova Aliança e EST 2 em Paranaíba, tendo a primeira sido encontrada apenas em fêmeas e a segunda, apenas em machos, nas frequências de 3% e 10%, respectivamente.

De modo geral, as bandas presentes nos dois sexos, com frequências diferentes, predominantemente em fêmeas, foram as bandas EST 1, EST 3, EST 4, EST 5, EST 6, EST 7 e EST 8.

**TABELA II.** Número de fêmeas e machos analisados de cada localidade e a frequência com que as 8 bandas foram apresentadas pelos mesmos.

| Origem das amostras | Sexo | Nº total de indivíduos analisados | Frequência das bandas nas amostras (%) |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------|------|-----------------------------------|----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                     |      |                                   | EST 1                                  | EST 2 | EST 3 | EST 4 | EST 5 | EST 6 | EST 7 | EST 8 |
| Nova Aliança        | F    | 93                                | 59                                     | 33    | 55    | 74    | 100   | 84    | -     | 3     |
|                     | M    | 92                                | 49                                     | 41    | 53    | 73    | 100   | 82    | -     | -     |
| Birigui             | F    | 85                                | 66                                     | 40    | 46    | 67    | 99    | 84    | -     | -     |
|                     | M    | 85                                | 34                                     | 28    | 34    | 45    | 99    | 74    | -     | -     |
| Cassilândia         | F    | 130                               | 25                                     | 15    | 36    | 58    | 98    | 35    | -     | -     |
|                     | M    | 130                               | 20                                     | 16    | 31    | 51    | 98    | 35    | -     | -     |
| Paranaíba           | F    | 20                                | 15                                     | -     | 60    | 75    | 100   | 60    | 15    | -     |
|                     | M    | 20                                | 10                                     | 10    | 35    | 45    | 100   | 50    | 5     | -     |

Diferentes. Destes padrões, 16 foram observados em fêmeas e machos, 2 padrões foram encontrados apenas em fêmeas e 2 apenas em machos.

Foram analisados 40 indivíduos de Paranaíba, sendo 20 fêmeas e 20 machos. Nesta população, também foram encontradas 7 bandas esterísticas, combinadas em 13 padrões diferentes. Destes padrões, 5 foram encontrados em fêmeas e machos, 4 padrões somente em fêmeas e outros 4 apenas em machos.

Na população de Birigui, foram analisados 170 indivíduos, sendo 85 fêmeas e 85 machos. Foram encontradas 6 bandas esterísticas, que se combinaram em 23 padrões diferentes. Do total de padrões observados, 14 foram detectados em fêmeas e machos, 5 deles apenas em fêmeas e 4 apenas em machos.

de 5% e 10%, respectivamente).

Duas bandas foram encontradas exclusivamente em um dos sexos: a banda EST 8 em Nova Aliança e EST 2 em Paranaíba, tendo a primeira sido encontrada apenas em fêmeas e a segunda, apenas em machos, nas frequências de 3% e 10%, respectivamente.

De modo geral, as bandas presentes nos dois sexos, com frequências diferentes, predominaram nas fêmeas, exceto a banda EST 2 em Nova Aliança.

Analizamos a combinação das diferentes bandas em cada indivíduo, de cada população, chamando cada uma delas de padrão individual.

Na Tabela III, estão relacionados os números de indivíduos analisados de cada sexo, por população, o número de padrões individuais observados e a frequência de indivíduos portadores do padrão predominante em cada população, separados por sexo. Observa-se que nenhum dos padrões predominantes apresentou frequência superior a 28% e inferior a 16%.

Na Tabela IV, temos o número total de padrões individuais diferentes que foram observados dentro de cada população, independentemente do sexo. Ainda nesta tabela, separamos o número destes padrões individuais que foram partilhados pelos dois sexos e os que foram detectados exclusivamente em um ou outro.

Na população de Nova Aliança, foram analisadas 185 moscas, sendo 93 fêmeas e 92 machos. Nesta amostra, foram encontradas 7 bandas esterásicas, que se combinaram em 20 padrões diferentes. Destes padrões, 16 foram observados em fêmeas e machos, 2 padrões foram encontrados apenas em fêmeas e 2 apenas em machos.

Foram analisados 40 indivíduos de Paranaíba, sendo 20 fêmeas e 20 machos. Nesta população, também foram encontradas 7 bandas esterásicas, combinadas em 13 padrões diferentes. Destes padrões, 5 foram encontrados em fêmeas e machos, 4 padrões somente em fêmeas e outros 4 apenas em machos.

Na população de Birigui, foram analisados 170 indivíduos, sendo 85 fêmeas e 85 machos. Foram encontradas 6 bandas esterásicas, que se combinaram em 23 padrões diferentes. Do total de padrões observados, 14 foram detectados em fêmeas e machos, 5 deles apenas em fêmeas e 4 apenas em machos.





**TABELA III.** Variabilidade dos padrões observados intrapopulação, para fêmeas e machos e, entre parênteses, a frequência de indivíduos portadores dos padrões predominantes.

| População    | FÊMEAS                     |                                          | MACHOS                     |                                          |
|--------------|----------------------------|------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------|
|              | Total de fêmeas analisadas | Número de padrões individuais observados | Total de machos analisados | Número de padrões individuais observados |
| Nova Aliança | 93                         | 18 (21%)                                 | 92                         | 18 (16%)                                 |
| Birigui      | 85                         | 19 (17%)                                 | 85                         | 18 (22%)                                 |
| Cassilândia  | 130                        | 20 (21%)                                 | 130                        | 20 (28%)                                 |
| Paranaíba    | 20                         | 10 (25%)                                 | 20                         | 9 (25%)                                  |
| <b>Total</b> | <b>328</b>                 | <b>67</b>                                | <b>327</b>                 | <b>65</b>                                |



Na amostra proveniente de Cassilândia, foram analisadas 260 moscas, sendo 130 fêmeas e 130 machos. Nesta população, também foram observadas 6 bandas estéricas, combinadas em 23 padrões diferentes. Destes padrões, 17 foram observados em fêmeas e machos, 3 foram observados apenas em fêmeas e outros 3, apenas em machos.

A figura 14 apresenta todos os padrões encontrados nas quatro populações e sua presença nas mesmas. Nas Tabelas V e VII são apresentadas as frequências com que esses padrões aparecem nas populações analisadas, considerando, respectivamente, os padrões comuns às quatro

**TABELA IV. Número de padrões individuais observados em cada população independentemente do sexo, partilhados pelos dois sexos e detectados exclusivamente em um ou outro sexo.**

| <b>População</b>    | <b>Total de indivíduos analisados</b> | <b>Número total de padrões</b> | <b>Número de padrões de ocorrência em ambos os sexos</b> | <b>Número de padrões exclusivos das fêmeas</b> | <b>Número de padrões exclusivos dos machos</b> |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>Nova Aliança</b> | 185                                   | 20                             | 16                                                       | 2                                              | 2                                              |
| <b>Birigui</b>      | 170                                   | 23                             | 14                                                       | 5                                              | 4                                              |
| <b>Cassilândia</b>  | 260                                   | 23                             | 17                                                       | 3                                              | 3                                              |
| <b>Paranaíba</b>    | 40                                    | 13                             | 5                                                        | 4                                              | 4                                              |

ambos os sexos. Na população de Birigui também foram observados 10 padrões, porém, apenas 5 foram de ocorrência comum a em fêmeas e machos. A população de Cassilândia apresentou 9 padrões e 6 deles foram de ocorrência em ambos os sexos. As frequências dos padrões com distribuição parcialmente comum foram de no mínimo 0,54% e no máximo 16,20%.

Quanto aos padrões individuais que foram exclusivos de cada população, verificou-se em Nova Aliança, apenas 1 padrão, de ocorrência em fêmeas, em Paranaíba, 4 padrões, sendo 1 deles somente nos machos, 2 somente nas fêmeas e 1 em ambos os sexos, na população de Birigui, também foram detectados 4, sendo 3 deles em machos e 1 em fêmeas e na população de Cassilândia, foram observados 5 padrões, sendo 2 deles de ocorrência em ambos os sexos, 2 apenas em machos e 1





Na amostra proveniente de Cassilândia, foram analisadas 260 moscas, sendo 130 fêmeas e 130 machos. Nesta população, também foram observadas 6 bandas esterásicas, combinadas em 23 padrões diferentes. Destes padrões, 17 foram observados em fêmeas e machos, 3 foram observados apenas em fêmeas e outros 3, apenas em machos.

A figura 14 apresenta todos os padrões encontrados nas quatro populações e sua presença nas mesmas. Nas Tabelas V a VII são apresentadas as frequências com que esses padrões aparecem nas populações analisadas, considerando, respectivamente, os padrões comuns às quatro populações, os parcialmente comuns e os exclusivos.

Nos 655 indivíduos distribuídos nas quatro populações analisadas neste trabalho, foram observados 34 padrões diferentes. O número máximo de bandas combinadas em um mesmo padrão foi 6 e o menor número foi de apenas 1 banda, havendo porém alguns indivíduos que não evidenciaram bandas. Esta última situação ocorreu na amostra de Cassilândia.

Dos 34 padrões observados, 9 foram detectados em todas as populações, que foram representados com um traçado contínuo na figura 14. A Tabela V mostra que estes padrões comuns apresentaram frequências de distribuição que variaram bastante entre as populações, com diferenças de até 20% entre uma população e outra, para o mesmo padrão.

Foram constatados os 11 padrões com distribuição parcialmente comuns nas populações analisadas, exceto na população de Paranaíba, onde nenhum destes padrões foi detectado. Na população de Nova Aliança foram observados 10 desses 11 padrões, sendo 7 de ocorrência em ambos os sexos. Na população de Birigui também foram observados 10 padrões, porém, apenas 5 foram de ocorrência comum a em fêmeas e machos. A população de Cassilândia apresentou 9 padrões e 6 deles foram de ocorrência em ambos os sexos. As frequências dos padrões com distribuição parcialmente comum foram de no mínimo 0,54% e no máximo 16,20%.

Quanto aos padrões individuais que foram exclusivos de cada população, verificou-se em Nova Aliança, apenas 1 padrão, de ocorrência em fêmeas, em Paranaíba, 4 padrões, sendo 1 deles somente nos machos, 2 somente nas fêmeas e 1 em ambos os sexos, na população de Birigui, também foram detectados 4, sendo 3 deles em machos e 1 em fêmeas e na população de Cassilândia, foram observados 5 padrões, sendo 2 deles de ocorrência em ambos os sexos, 2 apenas em machos e 1



## Populações analisadas

| Padrões     | Nova Aliança  | Birigui     | Cassilândia | Paranaíba  |
|-------------|---------------|-------------|-------------|------------|
| 1 3 4 5 6 8 |               |             |             |            |
| 1 3 4 5 6 7 |               |             |             |            |
| 2 3 4 5 6 7 |               |             |             |            |
| 1 2 3 4 5 6 |               |             |             |            |
| 1 3 4 5 6   |               |             |             |            |
| 3 4 5 6 7   | F 20 (21,50%) | 15 (17,65%) | 3 (2,31%)   |            |
| 1 2 4 5 6   | M 8 (8,33%)   | 5 (5,88%)   | 3 (2,31%)   | 1 (5,00%)  |
| 2 3 4 5 6   | T 29 (15,70%) | 20 (11,76%) | 6 (2,31%)   | 1 (2,50%)  |
| 1 2 3 4 5   |               |             |             |            |
| 2 3 4 5     | F 18 (19,35%) | 13 (15,30%) | 7 (5,38%)   | 2 (10,00%) |
| 1 2 5 6     | M 10 (10,42%) | 6 (7,06%)   | 7 (5,38%)   | -          |
| 1 4 5 6     | T 28 (14,74%) | 15 (11,18%) | 14 (5,38%)  | 2 (5,00%)  |
| 3 4 5 6     | F 2 (2,22%)   | 2 (2,35%)   | 14 (10,77%) | 1 (25,00%) |
| 1 3 4 5     | M 6 (6,32%)   | 6 (7,06%)   | 6 (4,62%)   | 3 (15,00%) |
| 2 4 5 6     | T 9 (4,86%)   | 8 (4,70%)   | 20 (7,69%)  | 8 (20,00%) |
| 1 2 4 5     |               |             |             |            |
| 1 4 5       | F 6 (6,45%)   | 2 (2,35%)   | 11 (8,46%)  | 3 (15,00%) |
| 2 5 6       | M 2 (2,22%)   | 2 (2,35%)   | 11 (8,46%)  | 3 (15,00%) |
| 3 4 5       | T 11 (5,85%)  | 1 (1,18%)   | 20 (7,69%)  | 6 (15,00%) |
| 4 5 6       | F 6 (6,45%)   | 3 (3,53%)   | 6 (4,62%)   | 2 (10,00%) |
| 1 5 6       | M 3 (3,26%)   | 3 (3,53%)   | 8 (6,15%)   | -          |
| 1 2 5       | T 2 (4,80%)   | 6 (7,06%)   | 14 (5,38%)  | 2 (5,00%)  |
| 1 3 4       | F 8 (8,60%)   | 11 (12,94%) | 4 (3,08%)   | -          |
| 2 4 5       | M 3 (3,26%)   | 4 (4,70%)   | 1 (0,77%)   | 1 (5,00%)  |
| 1 5         | T 11 (5,85%)  | 13 (8,82%)  | 2 (0,77%)   | 1 (2,50%)  |
| 4 5         |               |             |             |            |
| 5 6         | F 8 (8,60%)   | 2 (2,35%)   | 8 (6,15%)   | 1 (5,00%)  |
| 5 7         | M 1 (1,09%)   | 15 (17,65%) | 12 (9,23%)  | 4 (20,00%) |
| 2 5         | T 9 (4,86%)   | 21 (12,35%) | 20 (7,69%)  | 2 (5,00%)  |
| 1 4         | F 3 (3,22%)   | 1 (1,18%)   | 16 (12,30%) | 1 (5,00%)  |
| 5           | M 1 (1,09%)   | 1 (1,18%)   | 9 (6,93%)   | 5 (25,00%) |
| 4           | T 4 (2,16%)   | 2 (1,18%)   | 23 (9,61%)  | 6 (15,00%) |
| 6           |               |             |             |            |
| sem bandas  | F 6 (6,45%)   | 5 (5,88%)   | 28 (21,54%) | 3 (15,00%) |
|             | M 5 (5,43%)   | 12 (13,04%) | 1 (0,77%)   | 1 (5,00%)  |
|             | T 11 (5,85%)  | 17 (10,00%) | 65 (25,00%) | 4 (10,00%) |

Figura 14. Distribuição dos 34 padrões diferentes encontrados nas quatro populações de *Haematobia irritans* analisadas.





TABELA VI. Padrões individuais com distribuição parcialmente comum nas populações analisadas, número de indivíduos que apresentam estes padrões e suas frequências, separadamente por sexo e no total.

TABELA V. Padrões individuais comuns às quatro populações, número de indivíduos que os apresentam e suas frequências, separadamente por sexo e no total.

| Padrões comuns | Sexo | Populações e frequências |             |             |            |
|----------------|------|--------------------------|-------------|-------------|------------|
|                |      | Nova Aliança             | Birigui     | Cassilândia | Paranaíba  |
| 1 2 3 4 5 6    | F    | 20 (21,50%)              | 15 (17,65%) | 3 (2,31%)   | -          |
|                | M    | 9 (9,80%)                | 5 (5,88%)   | 3 (2,31%)   | 1 (5,00%)  |
|                | T    | 29 (15,70%)              | 20 (11,76%) | 6 (2,31%)   | 1 (2,50%)  |
| 1 3 4 5 6      | F    | 18 (19,35%)              | 13 (15,30%) | 7 (5,38%)   | 2 (10,00%) |
|                | M    | 10 (10,87%)              | 6 (7,06%)   | 7 (5,38%)   | -          |
|                | T    | 28 (15,13%)              | 19 (11,18%) | 14 (5,38%)  | 2 (5,00%)  |
| 3 4 5 6        | F    | 3 (3,22%)                | 2 (2,35%)   | 14 (10,77%) | 5 (25,00%) |
|                | M    | 6 (6,52%)                | 6 (7,06%)   | 6 (4,62%)   | 3 (15,00%) |
|                | T    | 9 (4,86%)                | 8 (4,70%)   | 20 (7,69%)  | 8 (20,00%) |
| 3 4 5          | F    | 6 (6,45%)                | 2 (2,35%)   | 11 (8,46%)  | 3 (15,00%) |
|                | M    | 5 (5,43%)                | 2 (2,35%)   | 11 (8,46%)  | 3 (15,00%) |
|                | T    | 11 (5,95%)               | 4 (2,35%)   | 22 (8,46%)  | 6 (15,00%) |
| 4 5 6          | F    | 6 (6,45%)                | 3 (3,53%)   | 6 (4,62%)   | 2 (10,00%) |
|                | M    | 3 (3,26%)                | 3 (3,53%)   | 8 (6,15%)   | -          |
|                | T    | 9 (4,86%)                | 6 (3,53%)   | 14 (5,38%)  | 2 (5,00%)  |
| 1 5 6          | F    | 8 (8,60%)                | 11 (12,94%) | 1 (0,77%)   | -          |
|                | M    | 3 (3,26%)                | 4 (4,70%)   | 1 (0,77%)   | 1 (5,00%)  |
|                | T    | 11 (5,95%)               | 15 (8,82%)  | 2 (0,77%)   | 1 (2,50%)  |
| 5 6            | F    | 8 (8,60%)                | 2 (2,35%)   | 8 (6,15%)   | 1 (5,00%)  |
|                | M    | 1 (1,09%)                | 19 (22,35%) | 12 (9,23%)  | 4 (20,00%) |
|                | T    | 9 (4,86%)                | 21 (12,35%) | 20 (7,69%)  | 5 (12,50%) |
| 4 5            | F    | 3 (3,22%)                | 1 (1,18%)   | 16 (12,30%) | 1 (5,00%)  |
|                | M    | 1 (1,09%)                | 1 (1,18%)   | 9 (6,93%)   | 5 (25,00%) |
|                | T    | 4 (2,16%)                | 2 (1,18%)   | 25 (9,61%)  | 6 (15,00%) |
| 5              | F    | 6 (6,45%)                | 5 (5,88%)   | 28 (21,54%) | 3 (15,00%) |
|                | M    | 5 (5,43%)                | 12 (13,04%) | 37 (28,46%) | 1 (5,00%)  |
|                | T    | 11 (5,95%)               | 17 (10,00%) | 65 (25,00%) | 4 (10,00%) |

**TABELA VI.** Padrões individuais com distribuição parcialmente comum nas populações analisadas, número de indivíduos que apresentam estes padrões e suas frequências, separadamente por sexo e no total.

| Padrões   | Sexo | Populações e frequências |            |             |           |
|-----------|------|--------------------------|------------|-------------|-----------|
|           |      | Nova Aliança             | Birigui    | Cassilândia | Paranaíba |
| 1 2 4 5 6 | F    | 1 (1,07%)                | 5 (5,88%)  | -           | -         |
|           | M    | 7 (7,60%)                | -          | -           | -         |
|           | T    | 8 (4,32%)                | 5 (2,94%)  | -           | -         |
| 2 3 4 5 6 | F    | 5 (5,37%)                | 6 (7,05%)  | 3 (2,30%)   | -         |
|           | M    | 15 (16,30%)              | 6 (7,05%)  | 4 (3,07%)   | -         |
|           | T    | 30 (16,20%)              | 12 (7,05%) | 7 (2,69%)   | -         |
| 2 3 4 5   | F    | 1 (1,07%)                | -          | 3 (2,30%)   | -         |
|           | M    | 1 (1,08%)                | -          | 5 (3,84%)   | -         |
|           | T    | 2 (1,08%)                | -          | 8 (3,47%)   | -         |
| 1 2 5 6   | F    | 1 (1,07%)                | 3 (3,52%)  | -           | -         |
|           | M    | 7 (7,60%)                | 3 (3,52%)  | -           | -         |
|           | T    | 8 (4,32%)                | 6 (3,52%)  | -           | -         |
| 1 4 5 6   | F    | 2 (2,15%)                | 5 (5,88%)  | 2 (1,54%)   | -         |
|           | M    | 4 (4,34%)                | 5 (5,88%)  | -           | -         |
|           | T    | 6 (3,24%)                | 10 (5,88%) | 2 (0,76%)   | -         |
| 1 3 4 5   | F    | -                        | 1 (1,17%)  | 5 (3,84%)   | -         |
|           | M    | 3 (3,26%)                | 2 (2,35%)  | 4 (3,07%)   | -         |
|           | T    | 3 (1,62%)                | 3 (1,76%)  | 9 (3,46%)   | -         |
| 2 4 5 6   | F    | -                        | 2 (2,35%)  | 2 (1,54%)   | -         |
|           | M    | 3 (3,26%)                | -          | 2 (1,54%)   | -         |
|           | T    | 3 (1,62%)                | 2 (1,17%)  | 4 (1,54%)   | -         |
| 1 2 5     | F    | -                        | -          | -           | -         |
|           | M    | -                        | 2 (2,35%)  | 5 (3,84%)   | -         |
|           | T    | -                        | 2 (1,17%)  | 5 (2,17%)   | -         |
| 1 4 5     | F    | 1 (1,07%)                | 2 (2,35%)  | 2 (1,54%)   | -         |
|           | M    | -                        | -          | 4 (3,07%)   | -         |
|           | T    | 1 (0,54%)                | 2 (1,17%)  | 6 (2,30%)   | -         |
| 2 5 6     | F    | 3 (3,22%)                | 3 (3,52%)  | -           | -         |
|           | M    | 8 (8,06%)                | 6 (7,05%)  | 2 (1,54%)   | -         |
|           | T    | 11 (5,94%)               | 9 (5,29%)  | 2 (0,77%)   | -         |
| 5 1       | F    | 1 (1,07%)                | 1 (1,17%)  | 3 (2,30%)   | -         |
|           | M    | 1 (1,08%)                | -          | 5 (3,84%)   | -         |
|           | T    | 2 (1,08%)                | 1 (0,58%)  | 8 (3,07%)   | -         |



TABELA VII. Padrões individuais exclusivos de cada população, número de indivíduos que apresentam estes padrões e suas frequências, separadamente por sexo e no total.

| Padrões exclusivos | Sexo | Populações e frequências |           |             |           |
|--------------------|------|--------------------------|-----------|-------------|-----------|
|                    |      | Nova Aliança             | Birigui   | Cassilândia | Paranaíba |
| 1 3 4 5 6 8        | F    | 3 (3,22%)                | -         | -           | -         |
|                    | M    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | T    | 3 (1,62%)                | -         | -           | -         |
| 1 3 4 5 6 7        | F    | -                        | -         | -           | 1 (5,00%) |
|                    | M    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | T    | -                        | -         | -           | 1 (2,50%) |
| 2 3 4 5 6 7        | F    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | M    | -                        | -         | -           | 1 (5,00%) |
|                    | T    | -                        | -         | -           | 1 (2,50%) |
| 3 4 5 6 7          | F    | -                        | -         | -           | 1 (5,00%) |
|                    | M    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | T    | -                        | -         | -           | 1 (2,50%) |
| 1 2 3 4 5          | F    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | M    | -                        | 2 (2,35%) | -           | -         |
|                    | T    | -                        | 2 (1,17%) | -           | -         |
| 1 2 4 5            | F    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | M    | -                        | 1 (1,17%) | -           | -         |
|                    | T    | -                        | 1 (0,58%) | -           | -         |
| 1 3 4              | F    | -                        | -         | 1 (0,77%)   | -         |
|                    | M    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | T    | -                        | -         | 1 (0,38%)   | -         |
| 2 4 5              | F    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | M    | -                        | -         | 2 (1,54%)   | -         |
|                    | T    | -                        | -         | 2 (0,77%)   | -         |
| 5 7                | F    | -                        | -         | -           | 1 (5,00%) |
|                    | M    | -                        | -         | -           | 1 (5,00%) |
|                    | T    | -                        | -         | -           | 2 (5,00%) |
| 1 4                | F    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | M    | -                        | -         | 1 (0,77%)   | -         |
|                    | T    | -                        | -         | 1 (0,38%)   | -         |
| 2 5                | F    | -                        | -         | 4 (3,07%)   | -         |
|                    | M    | -                        | -         | 3 (2,30%)   | -         |
|                    | T    | -                        | -         | 7 (2,70%)   | -         |
| 4                  | F    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | M    | -                        | 1 (1,17%) | -           | -         |
|                    | T    | -                        | 1 (0,58%) | -           | -         |
| 6                  | F    | -                        | 1 (1,17%) | -           | -         |
|                    | M    | -                        | -         | -           | -         |
|                    | T    | -                        | 1 (0,58%) | -           | -         |
| sem bandas         | F    | -                        | -         | 2 (1,54%)   | -         |
|                    | M    | -                        | -         | 3 (2,30%)   | -         |
|                    | T    | -                        | -         | 5 (1,92%)   | -         |

apenas em fêmeas. As frequências dos padrões exclusivos foram de no mínimo 0,58% e no máximo de 5%.

As figuras 15 a 18 apresentam a distribuição dos padrões detectados em cada população, para fêmeas e machos.

Estas figuras mostram que o padrão predominante diferiu entre fêmeas e machos em todas as populações, exceto Cassilândia. Nesta população, o gráfico da figura 17 mostra que, de modo geral, os padrões de fêmeas e machos são bastante coincidentes quanto à frequência. Nas demais populações, essas frequências são mais diferenciadas, como mostram as figuras 15, 16 e 18.

Testes de  $X^2$  (Qui-quadrado) foram realizados para comparação das populações analisadas quanto às frequências dos padrões de bandas. As comparações foram realizadas utilizando-se apenas os padrões comuns no total ou, separadamente, para fêmeas e machos.

O objetivo dessas comparações foi verificar se determinados padrões, isto é, aqueles comuns a fêmeas e machos, dentro de cada população, ou comuns a fêmeas e comuns a machos de populações diferentes mantinham-se em frequências consideradas não significativamente diferentes.

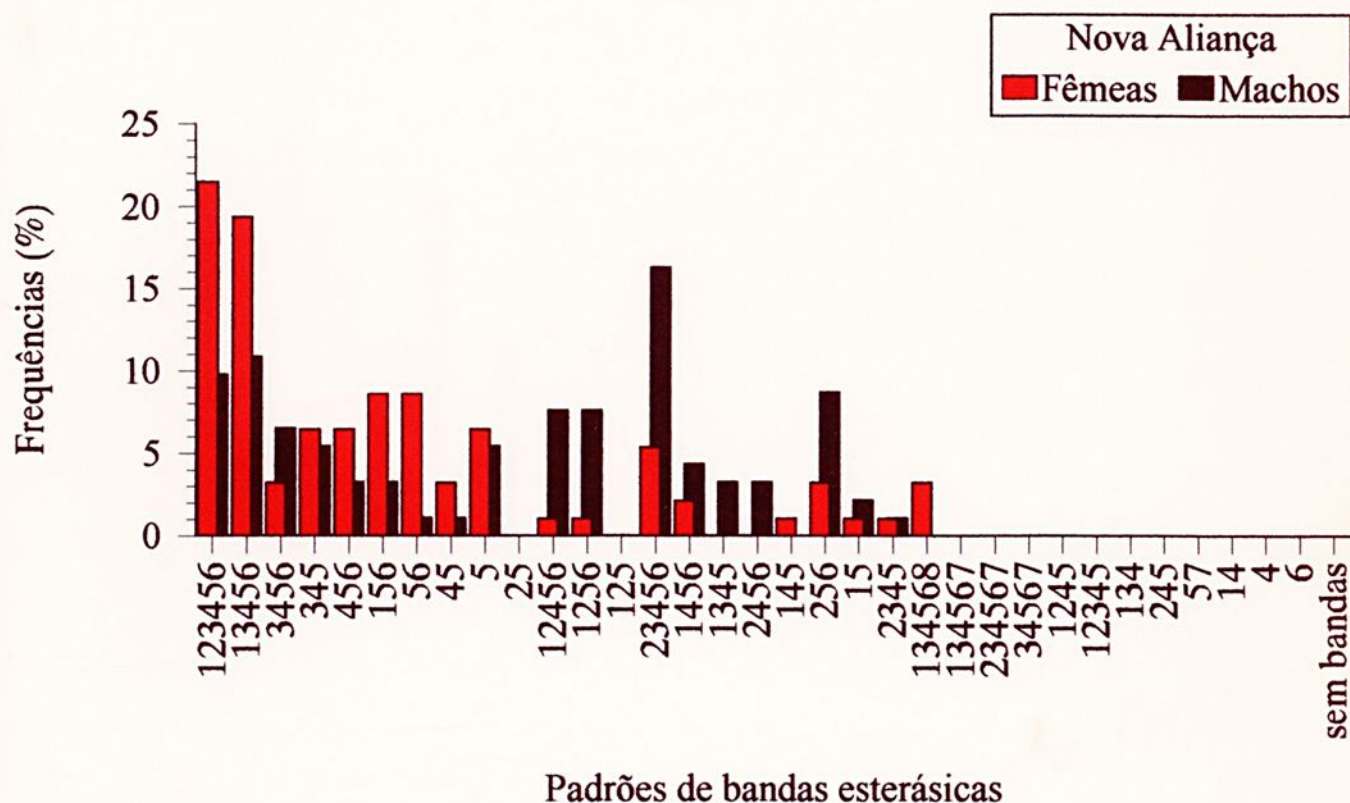
Nessas comparações foram utilizados dois procedimentos: os padrões que apareceram em um número de indivíduos menor que 5 foram reunidos (padrões agrupados ou PA) ou foram considerados separadamente (padrões não agrupados ou PNA). As quatro comparações entre fêmeas e machos, em cada população, mostraram diferenças significativas, ao nível de  $P < 0,05$ , apenas em Nova Aliança e Birigui. Nas populações de Cassilândia e Paranaíba, as diferenças não foram significativas (Tabela VIII).

As comparações de fêmeas de todas as populações, tomadas duas a duas mostraram que não diferem significativamente apenas as fêmeas de Birigui com as de Nova Aliança e as fêmeas de Paranaíba com as de Birigui. As comparações entre os machos mostraram diferenças significativas em todos os casos (Tabela IX).

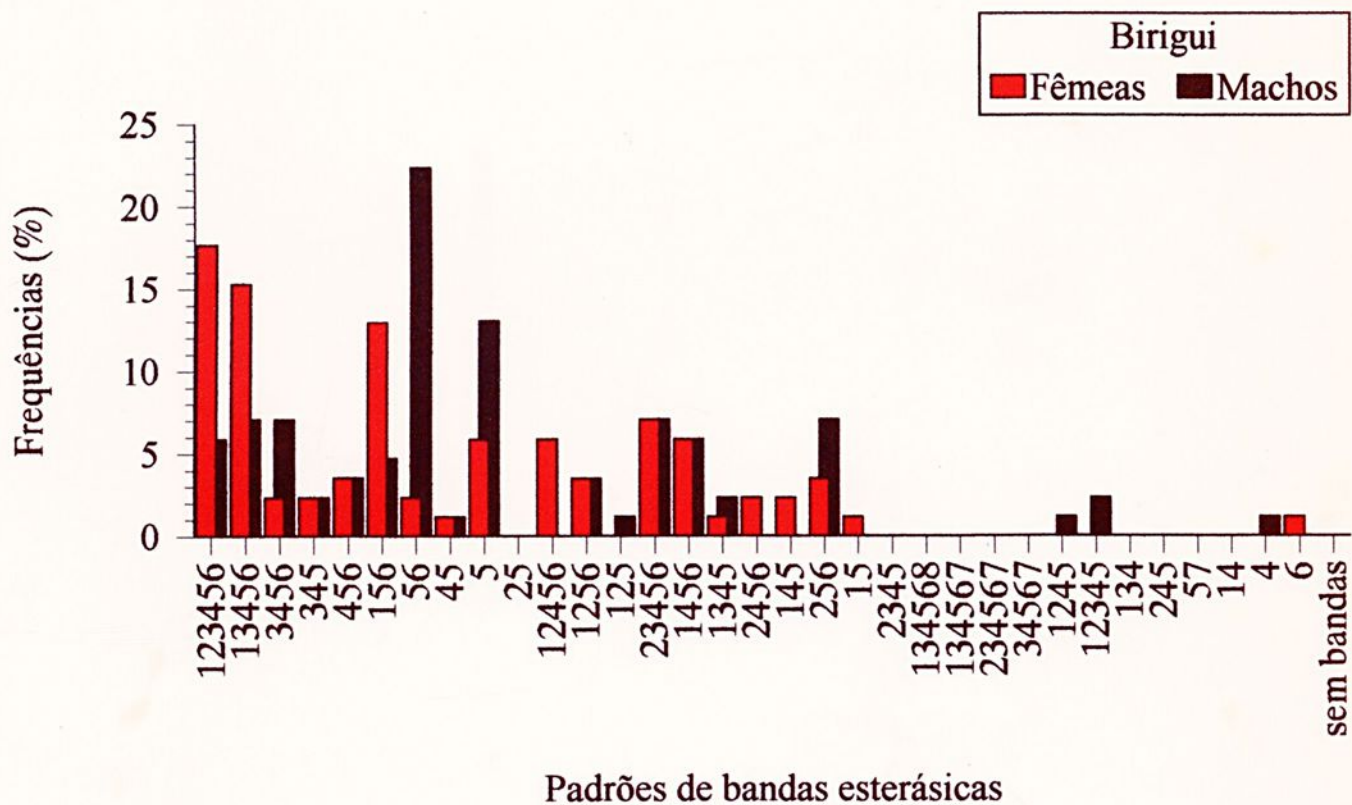
Para o cálculo dos valores de  $X^2$  da população de Paranaíba, mostrados nas Tabelas VIII e IX, os padrões comuns não foram agrupados, pois todos eles possuíam um número de indivíduos menor que 5. Nesta análise também foram desconsiderados os padrões 2 e 5 nos machos e 1 e 6 nas fêmeas, uma vez que estes não foram detectados nestes sexos, nesta população.





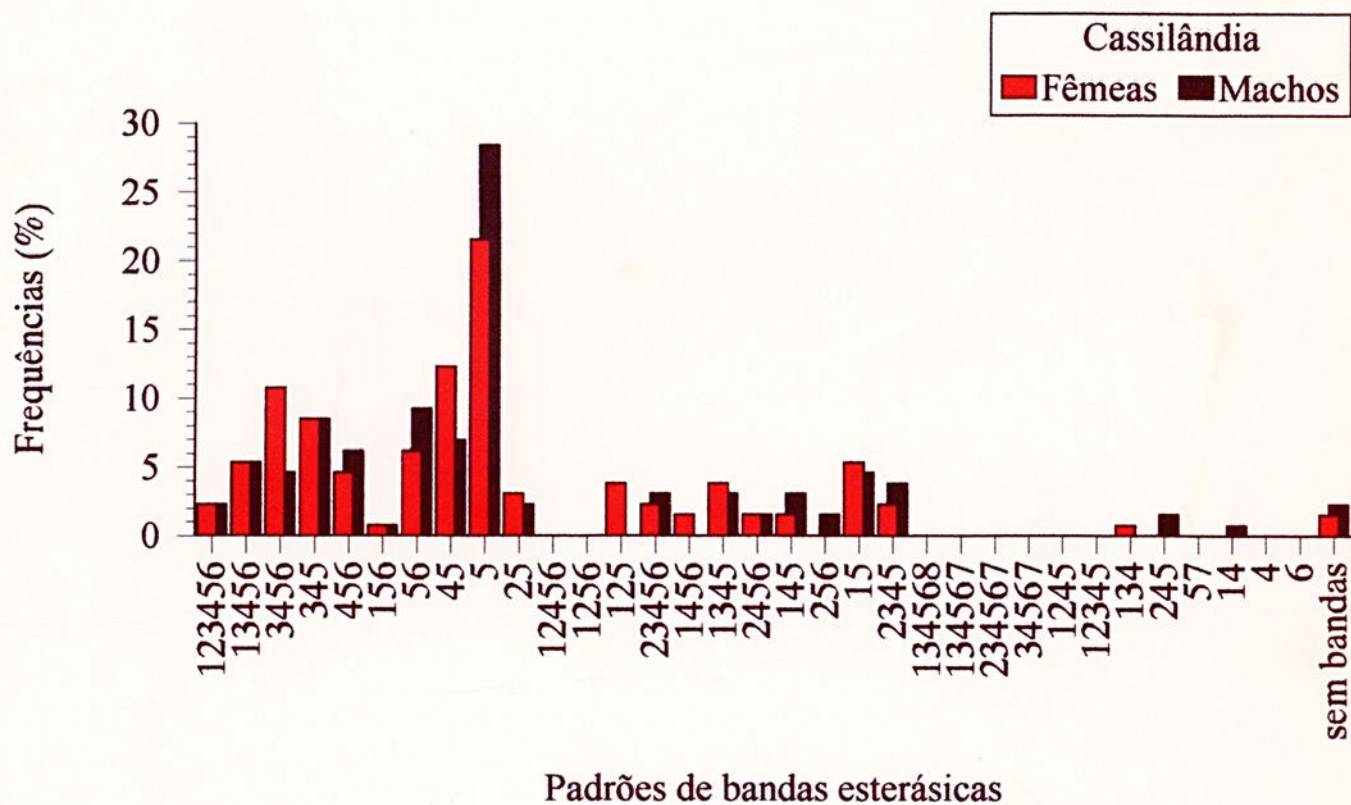


**Figura 15.** Distribuição das frequências dos 34 padrões de bandas esterásicas e as frequências dos mesmos, em fêmeas e machos da população de Nova Aliança, SP.

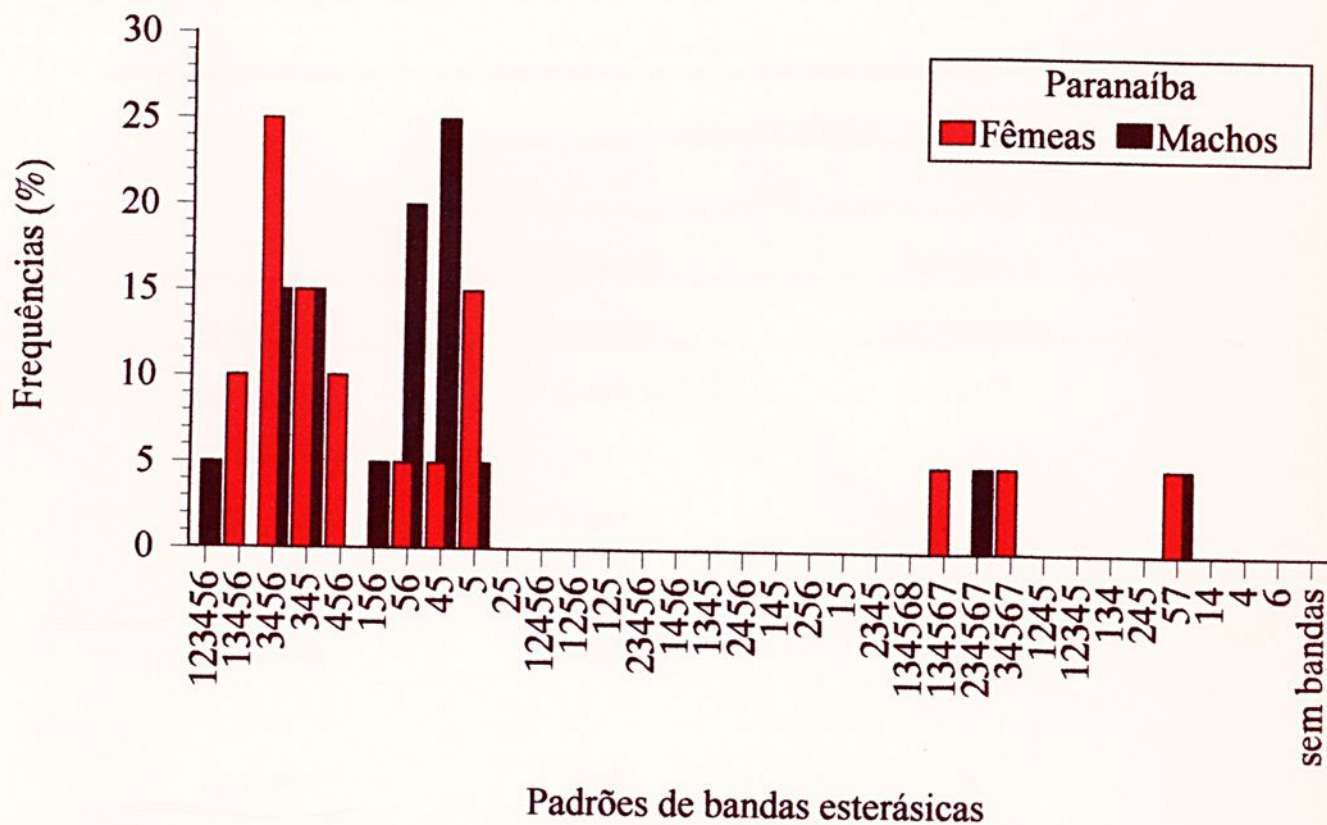


**Figura 16.** Distribuição das frequências dos 34 padrões de bandas esterásicas e as frequências dos mesmos, em fêmeas e machos da população de Birigui, SP.





**Figura 17.** Distribuição das frequências dos 34 padrões de bandas esterásicas e as frequências dos mesmos, em fêmeas e machos da população de Cassilândia, MS.



**Figura 18.** Distribuição das frequências dos 34 padrões de bandas esterásicas e as frequências dos mesmos, em fêmeas e machos da população de Paranaíba, MS.



TABELA VIII. Comparações, pelo teste de  $X^2$ , entre fêmeas e machos de cada população analisada (\*  $P < 0,05$ ).

|              |             | Fêmeas x Machos  |  |               |  |
|--------------|-------------|------------------|--|---------------|--|
|              |             | $X^2$            |  |               |  |
|              |             | Padrões $\leq 5$ |  | Padrões $> 5$ |  |
| Populações   | Agrupados   | Não Agrupados    |  |               |  |
| Nova Aliança | PA          | 22,64*           |  |               |  |
|              | FNA         | 16,02*           |  |               |  |
| Birigui      | PA          | 3,95*            |  |               |  |
|              | FNA         | 16,02*           |  |               |  |
| Cassilândia  | PA          | 25,96*           |  |               |  |
|              | FNA         | 34,52*           |  |               |  |
| Paranaíba    | Cassilândia | 7,22             |  |               |  |
|              | FNA         | 23,74*           |  |               |  |
| Paranaíba    |             | 5,96             |  |               |  |

As comparações das frequências totais dos padrões comuns, entre as populações, mostraram diferenças significativas em todos os casos, exceto entre as populações de Nova Aliança e Birigui (Tabela X). Para o cálculo do  $\chi^2$  da amostra de Paranaíba, neste caso, alguns padrões comuns foram agrupado, pois a maioria dos valores de fêmeas e machos somados, foi maior do que 5, e

TABELA IX. Comparações, pelo teste de  $\chi^2$ , entre fêmeas (quadrante esquerdo inferior) e machos (quadrante direito superior) das 4 populações, considerando os padrões comuns (\*  $P < 0,05$ ).

|              |     | Nova Aliança | Birigui | Cassilândia | Paranaíba |   |
|--------------|-----|--------------|---------|-------------|-----------|---|
| Nova Aliança | PA  |              | 22,64*  | 49,12*      | -         |   |
|              | PNA |              | 5,99*   | 27,52*      | 16,02*    | M |
| Birigui      | PA  | 8,10         |         | 31,60*      | -         | A |
|              | PNA | 9,84         |         | 20,54*      | 27,40*    | C |
| Cassilândia  | PA  | 25,96*       | 18,32*  |             | -         | H |
|              | PNA | 54,52*       | 67,18*  |             | 45,81*    | O |
| Paranaíba    | PA  | -            | -       | -           |           | S |
|              | PNA | 23,74*       | 10,57   | 52,43*      |           |   |
| F Ê M E A S  |     |              |         |             |           |   |



As comparações das frequências totais dos padrões comuns, entre as populações, mostraram diferenças significativas em todos os casos, exceto entre as populações de Nova Aliança e Birigui (Tabela X). Para o cálculo do  $X^2$  da amostra de Paranaíba, neste caso, alguns padrões comuns foram agrupado, pois a maioria dos valores de fêmeas e machos somados, foi maior do que 5, e como nenhum padrão mostrou frequência igual a zero, todos foram considerados.

considerando os padrões comuns totais, de fêmeas e machos juntos  
(\*  $P < 0,05$ ).

|              |     | Birigui | Castilândia | Paranaíba |
|--------------|-----|---------|-------------|-----------|
| Nova Aliança | PA  | 14,03   | 78,71*      | 53,98*    |
|              | PNA | 14,09   | 102,32*     | 67,77*    |
| Birigui      | PA  |         | 57,60*      | 45,25*    |
|              | PNA |         | 88,39*      | 65,48*    |
| Castilândia  | PA  |         |             | 108,53*   |
|              | PNA |         |             | 110,74*   |

### III.2. Efeitos de alguns inibidores sobre as bandas esterásicas de *Haematobia irritans*

No presente estudo foi verificada a ação de alguns inibidores sobre as esterases de *Haematobia irritans*. Amostras de fêmeas e machos foram submetidas à cloroforose e em seguida pré-incubadas e coradas para esterases na presença dos inibidores. Paralelamente, géis controles, sem a presença de inibidores, foram submetidos ao mesmo procedimento para obtenção de uma referência de coloração.

**TABELA X.** Comparações, pelo teste de  $X^2$ , entre as populações analisadas, considerando os padrões comuns totais, de fêmeas e machos juntos (\*  $P < 0,05$ ).

|              |     | Birigui | Cassilândia | Paranaíba |
|--------------|-----|---------|-------------|-----------|
| Nova Aliança | PA  | 14,03   | 78,71*      | 53,98*    |
|              | PNA | 14,09   | 102,32*     | 67,77*    |
| Birigui      | PA  |         | 57,60*      | 45,25*    |
|              | PNA |         | 88,39*      | 65,48*    |
| Cassilândia  | PA  |         |             | 108,53*   |
|              | PNA |         |             | 110,74*   |

O fluoreto de sódio 5 mM apresentou uma ação inibitória significativa sobre todas as bandas esterásicas, sendo que, a EST 1 foi a única completamente inibida. Para a esterase EST 2, observamos uma inibição quase total e para EST 3 e EST 4, uma inibição moderada. No caso da EST 5, esta enzima mostrou uma pequena atividade após o tratamento com este composto (Figura 20 b).

Quando os géis foram submetidos ao tratamento com sulfato de escina 1 mM, verificamos uma inibição acentuada da EST 2 e total da banda correspondente à esterase EST 5. Para as demais bandas pode ser detectado uma leve inibição após esse tratamento (Figura 20 c).

O fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), utilizado na concentração 1 mM, inibiu moderadamente a banda EST 5 e, totalmente as demais bandas (Figura 21 b).

O sulfato de cobre 1mM apresentou inibição total das bandas EST 1 e EST 2, moderada das bandas EST 3 e EST 4, e uma leve inibição da banda esterásica EST 5 (Figura 21 d).



### III.2. Efeitos de alguns inibidores sobre as bandas esterásicas de *Haematobia irritans*

No presente estudo foi verificada a ação de alguns inibidores sobre as esterases de *Haematobia irritans*. Amostras de fêmeas e machos foram submetidas à eletroforese e em seguida pré-incubadas e coradas para esterases na presença dos inibidores. Paralelamente, géis controles, contendo as mesmas amostras, foram submetidos aos processos usuais de pré-incubação e coloração. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela XI e nas figuras 19 a 22.

A Tabela XI mostra os resultados da ação destes inibidores em cinco bandas esterásicas (EST 1 a EST 5). O padrão de inibição das bandas EST 6, EST 7 e EST 8 não foi estabelecido, pois, as referidas bandas, não foram detectadas nos géis analisados nestes experimentos. Os graus de inibição, apresentados nesta tabela, encontram-se classificados em ordem crescente de intensidade.

A figura 19 a-d mostra o efeito do malathion sobre as esterases da mosca-do-chifre. Esse inseticida, na concentração de 0,4 mM, inibiu completamente as bandas EST 1, EST 2 e EST 5. Entretanto, podemos ainda observar uma atividade residual para as bandas EST 3 e EST 4, indicando que estas enzimas não perderam totalmente sua atividade frente a esse composto.

O fluoreto de sódio 5 mM apresentou uma ação inibitória significativa sobre todas as bandas esterásicas, sendo que, a EST 1 foi a única completamente inibida. Para a esterase EST 2, observamos uma inibição quase total e para EST 3 e EST 4, uma inibição moderada. No caso da EST 5, esta enzima mostrou uma pequena atividade após o tratamento com este composto (Figura 20 b).

Quando os géis foram submetidos ao tratamento com sulfato de eserina 1 mM, verificamos uma inibição acentuada da EST 2 e total da banda correspondente à esterase EST 5. Para as demais bandas pode ser detectado uma leve inibição após esse tratamento (Figura 20 c).

O fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), utilizado na concentração 1 mM, inibiu moderadamente a banda EST 5 e, totalmente as demais bandas (Figura 21 b).

O sulfato de cobre 1mM apresentou inibição total das bandas EST 1 e EST 2, moderada das bandas EST 3 e EST 4, e uma leve inibição da banda esterásica EST 5 (Figura 21 d).



Com relação ao p-cloromercuribenzoato (pCMB) na concentração 0,01 mM, não foram detectados efeitos inibitórios significativos. Já para o beta-mercaptoetanol, não foi observada inibição das enzimas esterásicas quando este composto estava presente na concentração de 0,1 mM. Entretanto, efeito inverso ocorreu quando o beta-mercaptoetanol foi adicionado na concentração de 10 mM, mostrando uma inibição total das bandas esterásicas de *Haematobia irritans* (Figura 22 a-d).

Dentre os compostos testados, o ácido iodoacético e o Triton X-100 também não mostraram efeito inibitório sobre as esterases deste organismo (Figuras 20 d e 21 c, respectivamente).

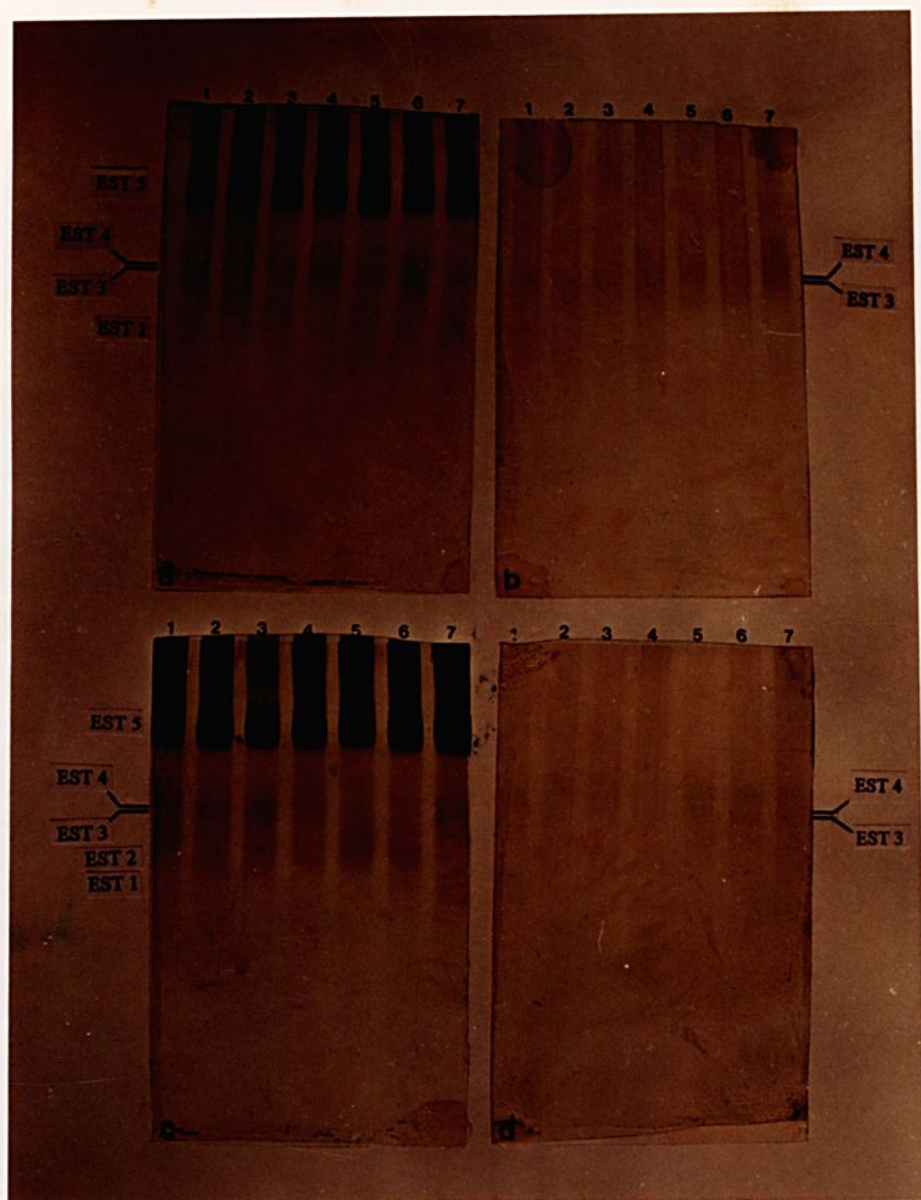
De modo geral, comparando-se machos e fêmeas, não foram detectadas diferenças no padrão inibitório destes compostos.

| Inibidores          | Concentração | Bandas esterásicas |       |       |       |       |
|---------------------|--------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
|                     |              | EST 1              | EST 2 | EST 3 | EST 4 | EST 5 |
| Malathion           | 0,4 mM       | ++++               | +++   | ++    | ++    | +++   |
| Fluoreto de sódio   | 5 mM         | ++++               | +++   | ++    | ++    | +++   |
| Sulfato de eorina   | 1 mM         | +                  | +++   | +     | +     | ++++  |
| FMSF                | 1 mM         | ++++               | ++++  | ++++  | ++++  | ++    |
| Sulfato de cobre    | 1 mM         | ++++               | ++++  | ++    | ++    | +     |
| PCMB                | 0,01 mM      | -                  | -     | -     | -     | -     |
| Beta-mercaptoetanol | 0,1 mM       | -                  | -     | -     | -     | -     |
| "                   | 10 mM        | ++++               | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  |
| Ácido iodoacético   | 1 mM         | -                  | -     | -     | -     | -     |
| Triton X-100        | 1 %          | -                  | -     | -     | -     | -     |



TABELA XI. Efeito de diferentes inibidores sobre as bandas esterásicas de *Haematobia irritans*  
( - : ausência de inibição; +, ++, +++, +++++ : graus de inibição em ordem crescente).

| Inibidores          | Concentração | Bandas esterásicas |       |       |       |       |
|---------------------|--------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
|                     |              | EST 1              | EST 2 | EST 3 | EST 4 | EST 5 |
| Malathion           | 0,4 mM       | ++++               | ++++  | ++    | ++    | ++++  |
| Fluoreto de sódio   | 5 mM         | ++++               | +++   | ++    | ++    | +++   |
| Sulfato de eserina  | 1 mM         | +                  | +++   | +     | +     | ++++  |
| PMSF                | 1 mM         | ++++               | ++++  | ++++  | ++++  | ++    |
| Sulfato de cobre    | 1 mM         | ++++               | ++++  | ++    | ++    | +     |
| PCMB                | 0,01 mM      | -                  | -     | -     | -     | -     |
| Beta-mercaptoetanol | 0,1 mM       | -                  | -     | -     | -     | -     |
| "                   | 10 mM        | ++++               | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  |
| Ácido iodoacético   | 1 mM         | -                  | -     | -     | -     | -     |
| Triton X-100        | 1 %          | -                  | -     | -     | -     | -     |



**Figura 19 a-d.** Padrão de inibição das bandas esterásicas de *Haematobia irritans* obtido pelo uso do inseticida malathion com concentração 0,4 mM. a. Controle (1-7, fêmeas). b. Mesmas amostras utilizadas em a, submetidas à presença do malathion. c. Controle (1-7, machos). d. Mesmas amostras utilizadas em c, submetidas à presença do malathion.

Ácido indoxáctico 1 mM (1-4, fêmeas e 5-7, machos).



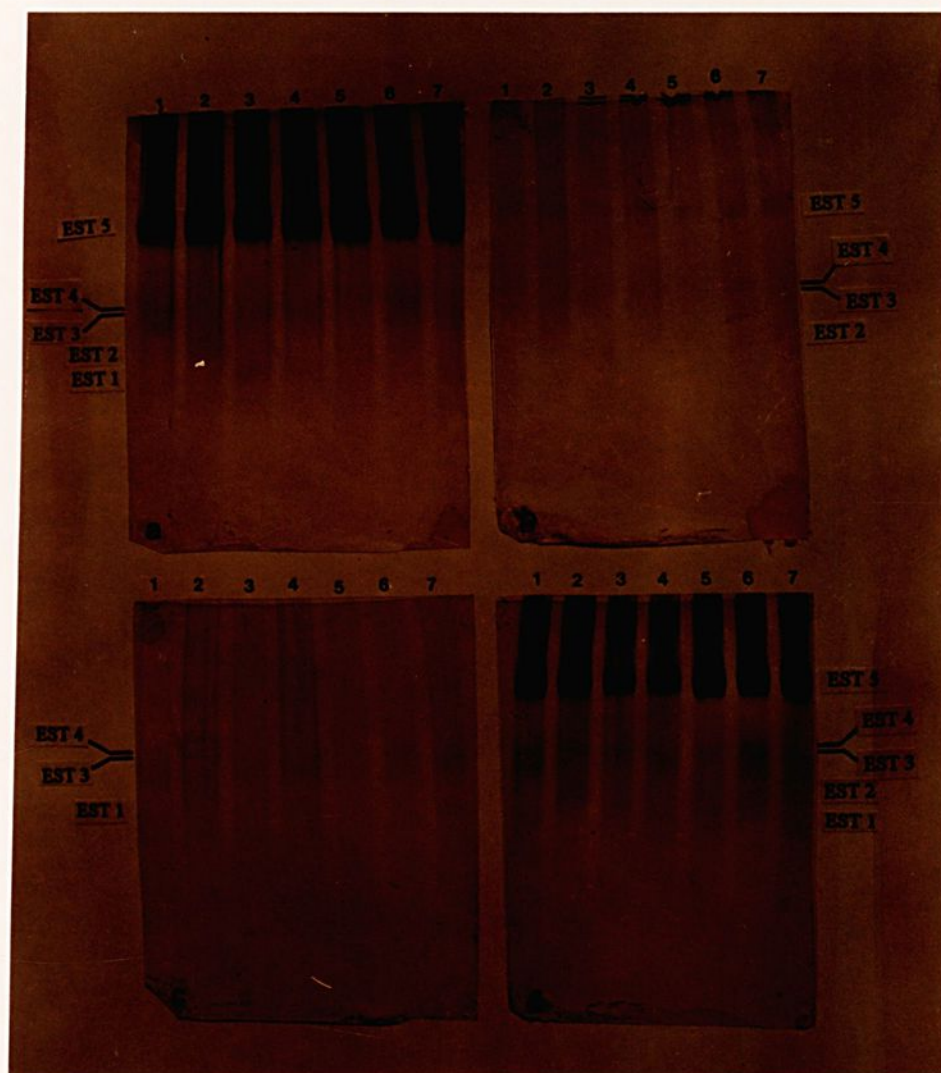


Figura 20 a-d. Padrão de inibição das bandas esterásicas de *Haematobia irritans* obtido pelo uso de diferentes inibidores. As mesmas amostras aplicadas em a foram repetidas nos demais géis. a. Controle (1-4, fêmeas e 5-7, machos). b. Fluoreto de sódio 5 mM (1-4, fêmeas e 5-7, machos). c. Sulfato de eserina 1 mM (1-4, fêmeas e 5-7, machos). d. Ácido iodoacético 1 mM (1-4, fêmeas e 5-7, machos).

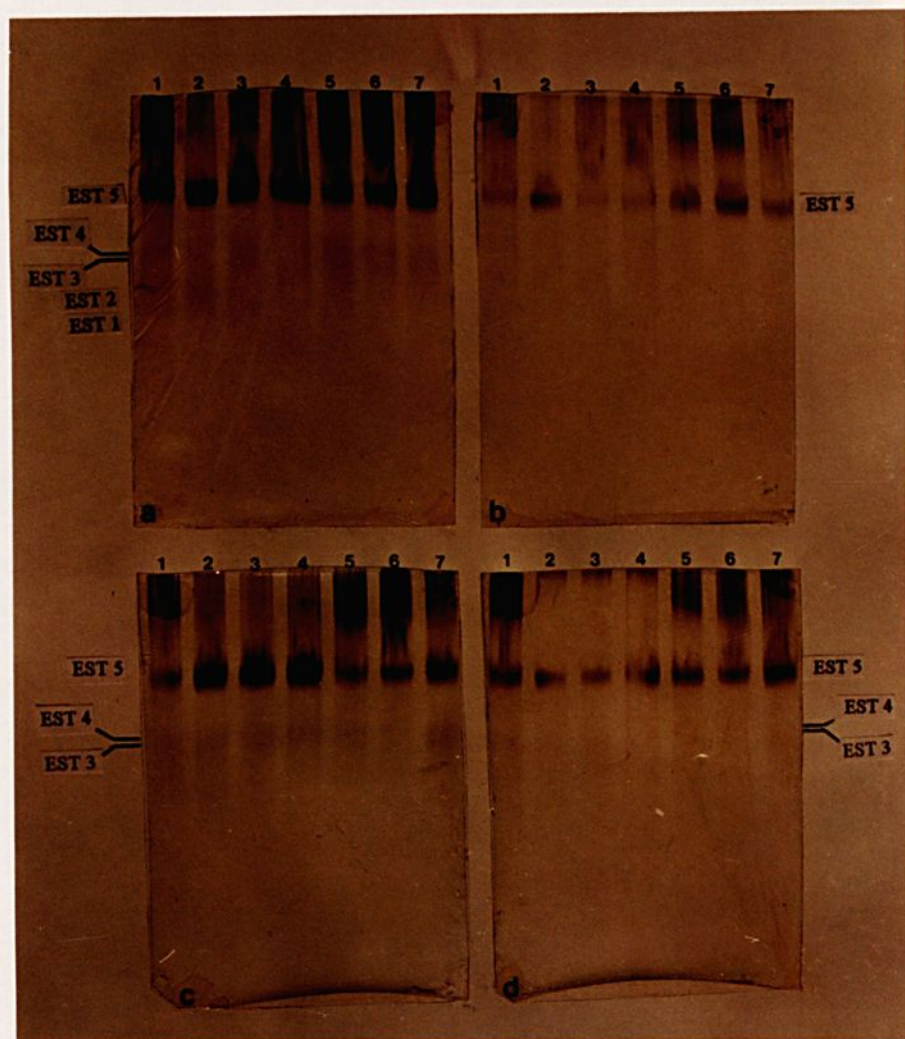
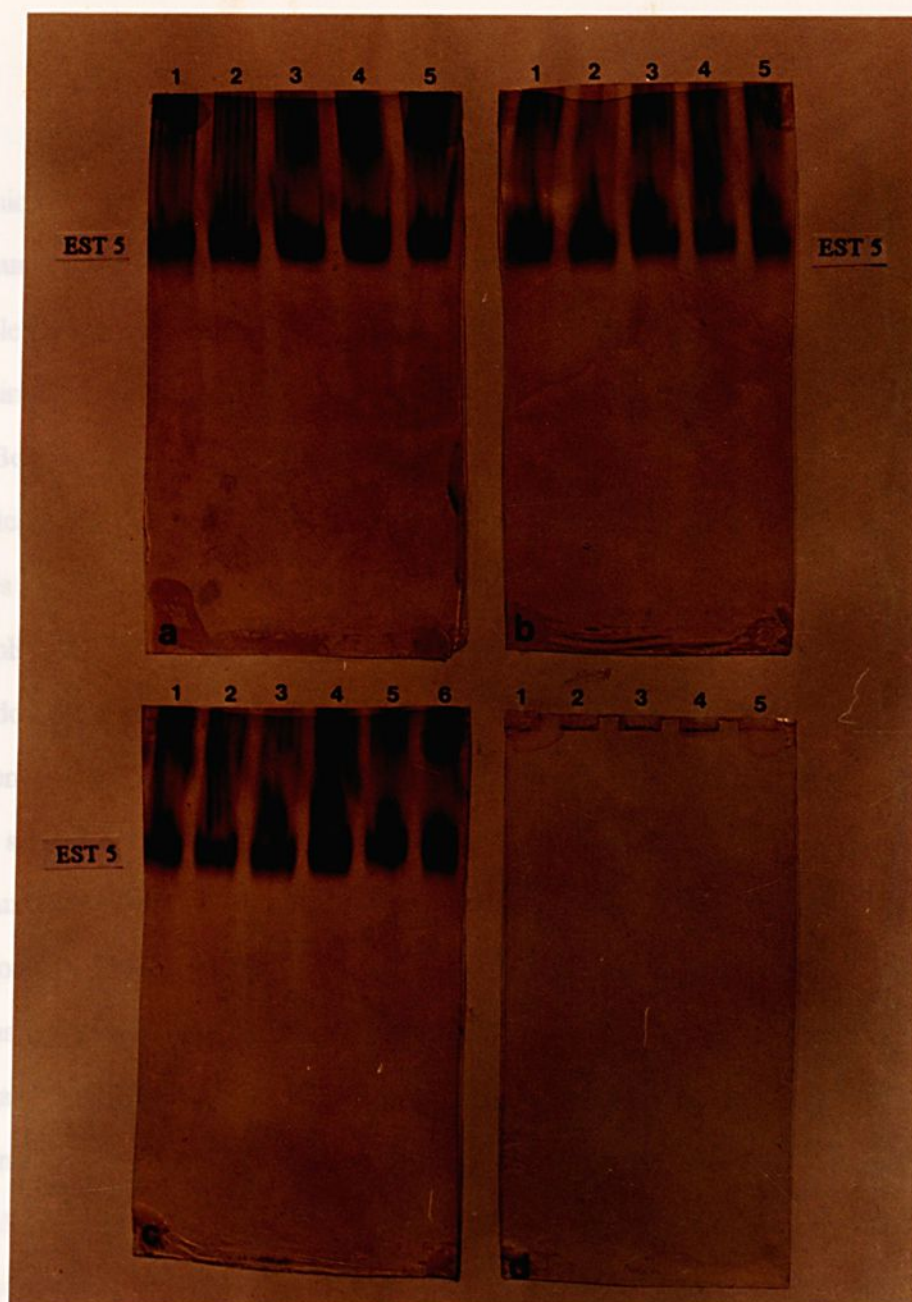


Figura 21 a-d. Padrão de inibição das bandas esterásicas de *Haematobia irritans* obtido pelo uso de diferentes inibidores. As mesmas amostras aplicadas em a foram repetidas nos demais géis. a. Controle (1-4, fêmeas e 5-7, machos). b. Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM (1-4, fêmeas e 5-7, machos). c. Triton X-100 1% (1-4, fêmeas e 5-7, machos). d. Sulfato de cobre 1 mM (1-4, fêmeas e 5-7, machos).





**Figura 22 a-d.** Padrão de inibição das bandas esterásicas de *Haematobia irritans* obtido pelo uso de diferentes inibidores. As mesmas amostras aplicadas em a foram repetidas nos demais géis. **a.** Controle (1-3, fêmeas e 4-5, machos). **b.** p-cloromercuribenzoato (pCMB) 0,01 mM (1-3, fêmeas e 4-5, machos). **c.** Beta-mercaptoetanol 0,1 mM (1-3, fêmeas e 4-6, machos). **d.** Beta-mercaptoetanol 10 mM (1-3, fêmeas e 4-5, machos).



#### IV. DISCUSSÃO

As técnicas de separação de proteínas, amplamente utilizadas nas últimas décadas, têm permitido descobrir numerosos polimorfismos protéicos em uma grande variedade de organismos. Diferentes formas moleculares de uma enzima (que são denominadas isoenzimas) têm sido descritas como específicas de um tecido, de um órgão, de uma fase do desenvolvimento ou de uma espécie (pequena revisão em Beckman & Johnson, 1964).

A técnica mais comum para distinguir diferentes formas genéticas de uma enzima é a eletroforese em gel. Os extratos a serem analisados são colocados num gel poroso, através do qual um potencial elétrico é aplicado. Se a composição de aminoácidos de uma dada enzima varia e se os aminoácidos substituídos portam cargas diferentes, as enzimas diferem em carga líquida e se movem em velocidades diferentes, separando-se no gel. Suas posições são encontradas no gel através do fornecimento de um substrato aliado a um corante. Este liga-se ao produto da reação enzima-substrato, o que produz uma banda colorida que indica a posição das enzimas. Diferentes genótipos são, assim, identificados pelas variações de posição das bandas no gel (Futuyma, 1992).

Entre as enzimas altamente polimórficas incluem-se as esterases, cujas variações têm sido estudadas em organismos tão diferentes como as bactérias (Sekar & Hageman, 1979; Brisabols & Goulett, 1993) e o homem (Harris, 1966; Mastropaolo & Yourho, 1981; Dufer *et al.*, 1984; Hojring & Svensmark, 1987 e Moretto *et al.*, 1994). No presente trabalho essa enzima foi analisada em quatro populações de *Haematobia irritans*, objetivando contribuir para o conhecimento da biologia deste importante ectoparasita de rebanhos.

Os zimogramas, obtidos a partir de géis de poliacrilamida, mostraram que essa espécie apresenta um número de bandas esterásicas reduzido, quando comparado com outras espécies de moscas, tais como as do gênero *Drosophila*. São apenas oito bandas esterásicas em *Haematobia irritans*, enquanto em *Drosophila* este número é maior, podendo variar de acordo com a espécie em questão. Em *D. melanogaster* foram identificadas 22 esterases, através da combinação de eletroforese em gel de poliacrilamida e focalização isoeletrica (Healy *et al.*, 1991). Em três espécies de *Drosophila* do grupo virilis (*D. virilis*, *D. americana* e *D. novamexicana*), McReynolds (1967) detectou 12



bandas esterásicas em oito populações naturais e duas linhagens mutantes mantidas em laboratório. Lapenta (1992) constatou 43 bandas esterásicas em oito linhagens isofêmeas da superespécie *D. serido* e Ceron (1988) detectou 17 bandas esterásicas em fêmeas e 20 em machos de *D. mulleri* e 13 em fêmeas e 17 em machos de *D. arizonensis*.

Outro aspecto digno de nota é o fato de que as esterases de *Haematobia irritans* parecem ser de um só tipo, aquele que hidrolisa preferencialmente o  $\alpha$ -naftil acetato, sendo assim, classificadas como  $\alpha$ -esterases. Este fato pode refletir uma maior afinidade do  $\alpha$ -naftil acetato ao centro ativo dessas enzimas.

Essa situação é diferente da encontrada na maioria dos organismos já analisados, os quais apresentam  $\alpha$  e  $\beta$  esterases. As espécies de *Drosophila* incluem-se nessa situação (por exemplo, em *D. mulleri* e *D. arizonensis*, Ceron, 1988; Nanya, 1993; em *D. serido*, Lapenta, 1992; em *D. melanogaster*, Wright & McIntyre, 1963, um dos trabalhos pioneiros em análise eletroforética de proteínas e Narise & Hubby, 1966).

O número reduzido de variantes esterásicas de *Haematobia irritans* talvez possa ser entendido como relacionado ao habitat e alimentação restritos desse organismo. Como foi mencionado na INTRODUÇÃO, *H. irritans* é parasita do gado e alimenta-se exclusivamente de sangue, na fase adulta, analisada no presente trabalho. Kojima *et al.* (1970 apud Cobbs, 1976) analisando esterases de *D. melanogaster* sugeriram que o grande número de alelos encontrados em locos como os das esterases é uma adaptação ao grande número de substratos sobre os quais essas enzimas atuam na natureza. Johnson (1973) sugeriu que o comportamento diferencial na regulação metabólica poderia ser um mecanismo seletivo para manter o polimorfismo em locos como das esterases. Por sua vez, Richardson *et al.* (1977) analisando a associação de mobilidade eletroforética e substratos larvais em espécies do complexo *Drosophila mulleri*, concluiu que parece haver uma associação entre a diversidade taxonômica dos substratos larvais e a diversidade eletromórfica das populações de *Drosophila* que utilizam aqueles substratos. Em *D. pseudoobscura* o alto grau de polimorfismo de esterases, como a EST 5, também tem sido associado à possibilidade de adaptação a diferentes dietas (Farmer & Carter, 1989).





A EST 5 em *Drosophila pseudoobscura* está presente no cromossomo X e é uma carboxilesterase encontrada no hemolinfa das larvas e dos adultos e, neste último, encontrada também nos olhos. Ela hidrolisa preferencialmente os ésteres de álcools de cadeia curta (Farmer & Carter, 1989). Sua função fisiológica não é conhecida. Arnason (1982) apresentou evidências de que a EST 5 era transferida de machos para as fêmeas durante a cópula, juntamente com o fluido seminal, como a esterase 6 de *D. melanogaster*, mas esta enzima não foi detectada nos órgãos reprodutivos dos machos. Segundo Cobbs (1976) existem pelo menos 30 alelos detectados para este loco enzimático e, como as esterases hidrolisam os ésteres ingeridos pelas moscas, um grande número de alelos diferentes neste loco, seria uma adaptação a um vasto número de substratos disponíveis para estas enzimas.

Outro exemplo de loco esterásico polimórfico que tem sido amplamente estudado é a esterase 6 em *Drosophila melanogaster*. Segundo Wright & McIntyre (1963) esta enzima apresenta especificidade ao  $\beta$ -naftil acetato. Mane *et al.* (1983) relataram duas alozimas principais, a EST 6<sup>F</sup> e a EST 6<sup>S</sup>. Ambas possuem atividade catalítica, propriedades moleculares e composição de aminoácidos similares, e ainda, estas duas enzimas possuem um único sítio catalítico. Essa esterase também foi detectada em duas espécies crípticas, *D. simulans* e *D. mauritiana*, mostrando em ambas, características semelhantes. Diversos experimentos, utilizando o critério da termoestabilidade *in vitro*, detectaram quatro variantes dentro do grupo EST 6<sup>F</sup> e 3 em EST 6<sup>S</sup> em *D. melanogaster*. Em uma pequena revisão da literatura, Labate *et al.* (1990) encontraram um total de dez alozimas diferentes para a esterase EST 6 nesta espécie. Estas alozimas se dividem em cinco classes maiores: EST 6<sup>U</sup>, EST 6<sup>VF</sup>, EST 6<sup>F</sup>, EST 6<sup>F</sup> e EST 6<sup>S</sup>, separadas por uma considerável diferença de mobilidade eletroforética. As primeiras três classes são incomuns e cada uma contém uma única variante alozímica. As outras duas classes, mais comuns, apresentam três e quatro variantes alozímicas menores, respectivamente.

No presente trabalho, as quatro populações analisadas apresentaram poucas diferenças com relação ao número e tipos de bandas, entendendo-se por tipo de banda, os diferentes graus de migração no gel, a partir da sua extremidade catódica, denotando que, apesar da procedência diferente, as quatro populações mantêm um padrão basicamente comum de esterases. As únicas diferenças detectadas referem-se às bandas EST 7 e EST 8, sendo que, a primeira foi detectada





exclusivamente em fêmeas e machos de Paranaíba e a segunda, exclusivamente em fêmeas de Nova Aliança. Devemos mencionar que, o número de indivíduos analisados na população de Paranaíba, comparativamente às outras populações, foi pequeno, de modo que os resultados referentes a essa população devem ser vistos com cautela. Contudo, a banda EST 7 mostrou-se bem evidenciada nessa população e não foi observada nos 615 indivíduos analisados das demais populações. Um aspecto que pode ser importante, no que se refere a essa população de Paranaíba, é que as amostras analisadas provinham de um rebanho nunca submetido a controle pelo uso de inseticidas, dada a introdução recente da infestação, na época.

Um único trabalho, de nosso conhecimento, realizado em *Haematobia irritans*, por McDonald *et al.* (1987), utilizando técnicas eletroforéticas em gel de amido e mais de 11 sistemas enzimáticos, inclusive esterases, embora não descreva detalhadamente os resultados de cada sistema, concluiu que, as nove populações da América do Norte e do Havaí analisadas, apresentam elevada identidade genética ( $0,989 \pm 0,007$ ), sugerindo que, pela falta de diferenciação significativa, não deve haver barreiras ao fluxo gênico, entre essas populações.

A análise das bandas esterásicas de *Haematobia irritans* mostrou duas bandas muito próximas (EST 3 e EST 4) quanto à migração no gel. Essas bandas ocorrem nos dois sexos e talvez estejam relacionadas entre si de alguma maneira. Isto porque a banda EST 3 só foi encontrada junto com a EST 4, sugerindo uma dependência daquela em relação a esta. A banda EST 4, porém, foi encontrada isoladamente. Essas observações são válidas para as quatro populações. Alguns autores sugeriram que as bandas que ocorrem sempre juntas seriam resultantes de um mecanismo desconhecido de montagem (*splicing*) diferencial do RNAm, ou então, devido a uma possível duplicação *em tandem* e uma íntima ligação entre esses genes (Tsuno *et al.*, 1984; Polyakova & Korochkin, 1986). Em *Drosophila serido*, Lapenta (1992) verificou quatro bandas esterásicas que ocorriam sempre em dupla e em altas frequências nos indivíduos analisados. Segundo esta autora, possíveis explicações para a duplicidade de bandas também seriam a presença de genes duplicados estreitamente ligados, a montagem diferencial dos RNAm ou ainda, por isoenzimas secundárias, decorrentes de modificações pós-traducionais. Contudo, de acordo com Lapenta (*opus cit*), outros



estudos mais direcionados a este problema devem ser realizados, a fim de se estabelecer com exatidão a relação entre estas bandas.

Outra diferença entre as populações analisadas foi observada quanto à presença da EST 2 em machos mas não em fêmeas de Paranaíba, na amostra constituída de 40 indivíduos (20 de cada sexo), enquanto sua presença foi constatada nos dois sexos das demais populações. Com a devida cautela, pelos motivos já mencionados, é possível que, nessa população, esta esterase seja macho-específica, enquanto que, a EST 8 exclusivamente observada em fêmeas de Nova Aliança, pode ser considerada fêmea-específica.

Esterases sexo-específicas foram observadas em algumas espécies de *Drosophila* (como por exemplo em *D. mulleri* e *D. arizonensis*) e *Aedes aegypti*. Ceron (1988) estudando o padrão de bandas destas duas espécies de *Drosophila*, detectou 2 esterases (as bandas 10 e 12) específicas dos machos em *D. mulleri*, 3 bandas esterásicas (9, 10 e 12) exclusivas dos machos de *D. arizonensis* e apenas 1 (a banda 7) específica das fêmeas dessa última espécie. Outros exemplos da ocorrência de bandas esterásicas sexo-específicas foram as obtidas por Lapenta (1992). Essa autora detectou 5 esterases específicas dos machos (as bandas 28, 30, 33, 35 e 37) em *D. serido* e 2 esterases, também específicas para os machos, em *D. koepferae* e nenhuma banda específica das fêmeas. Já Argentine & James (1995), utilizando várias técnicas bioquímicas combinadas, detectaram uma banda esterásica específica da glândula salivar (EST-SG) em *Aedes aegypti*, que pode ser exclusiva das fêmeas.

As esterases sexo-específicas constituem, em alguns casos, um bom modelo para estudos do controle da expressão gênica. Um exemplo interessante é o da esterase S em *Drosophila virilis*. O gene *est S*, que codifica para esta enzima, atua em um período bem definido do desenvolvimento (terceiro dia após a emergência) e em um tecido único, o epitélio dos bulbos ejacatórios nos machos. Sua atividade enzimática pode ser determinada pela hidrólise do  $\beta$ -naftil-acetato. Essa enzima é acumulada no bulbo ejacatório dos machos, excretada e transferida para os genitais das fêmeas durante a cópula, sendo responsável por processos de fertilização nas fêmeas (Sergeev *et al.*, 1993). Vários fatores estão envolvidos no controle da expressão deste gene e pelo menos três genes (localizados nos cromossomos X, IV e V) participam deste processo.





Em *Haematobia irritans*, diferenças no grau de atividade das bandas esterásicas, deduzidas a partir de diferenças de espessura e intensidade de coloração das bandas, foram relativamente comuns, atingindo todas as bandas. Essas variações foram encontradas entre indivíduos de mesma população ou populações diferentes e, provavelmente, fazem parte das diferenças individuais.

Entre as oito bandas detectadas nas quatro populações, uma foi altamente frequente (a EST 5), ocorrendo em 100% (Nova Aliança e Paranaíba) ou quase 100% (Birigui, 99% e Cassilândia, 98%) dos indivíduos. Uma banda enzimática com frequência tão elevada pode ser interpretada como correspondendo a uma proteína de função básica importante.

Outras bandas encontradas com frequências elevadas nessas populações, foram as bandas EST 6 e EST 4. Em todos os casos, essas bandas apresentaram frequências superiores a 45%, exceto a banda EST 6 em Cassilândia, cujas frequências foram de 35% para fêmeas e machos.

Foram encontrados vários casos de bandas cujas frequências diferiram de forma acentuada entre os sexos. Destacamos as bandas EST 1 e EST 4, em Birigui, e as bandas EST 3 e EST 4 em Paranaíba. É possível que essas diferenças estejam refletindo diferenças no papel fisiológico das enzimas, relacionado a características sexo-específicas. Mencionamos na INTRODUÇÃO que fêmeas e machos de *Haematobia irritans* têm necessidades alimentares bastante diferentes, da ordem de três vezes mais para fêmeas do que para machos. Em geral, na espécie analisada, como já foi dito, sempre que as bandas ocorrem com frequências diferentes em fêmeas e machos, essas frequências são maiores nas fêmeas, exceto no caso da banda EST 2 em Nova Aliança.

Com relação aos 34 padrões individuais observados, resultantes das combinações de bandas, os dados de frequências obtidos mostram que, para os padrões comuns às quatro populações, ocorreu:

1. diferença significativa entre fêmeas e machos dentro de cada população, exceto em Paranaíba;
2. diferença significativa em todas as comparações entre as populações, quanto aos padrões dos machos;





3. diferença significativa em todas as comparações entre as populações, quanto aos padrões das fêmeas, exceto na comparação entre fêmeas de Birigui com Nova Aliança e Birigui com Paranaíba;

4. diferença significativa em todas as comparações entre as populações, quanto aos padrões totais (soma de fêmeas e machos), exceto na comparação de Birigui com Nova Aliança.

Os resultados dessas comparações mostram, dessa forma, que mesmo considerando os padrões comuns às quatro populações, eles diferem quanto às frequências com que ocorrem e, portanto, essas populações não são iguais. A maior semelhança ocorre entre as populações de Nova Aliança e Birigui, que só se diferenciam pelas frequências dos padrões dos machos e, mesmo assim, por uma diferença que se encontra praticamente no limite de significância.

As mencionadas diferenças e semelhanças podem ser visualizadas nos gráficos de distribuição das frequências dos padrões, em que os picos, correspondentes aos padrões mais frequentes em cada população, podem ser comparados.

Padrões de bandas exclusivos foram encontrados em todas as populações, distribuídos da seguinte forma: 5 em Cassilândia, 4 em Paranaíba, 4 em Birigui e apenas 1 em Nova Aliança. A frequência desses padrões foi igual ou inferior a 5,00% em todos os casos. Todos os padrões específicos de Paranaíba envolviam a presença da banda EST 7, exclusiva desta população. Em Nova Aliança, o único padrão exclusivo apresentou a banda EST 8, também restrita a esta população.

Alguns padrões foram partilhados por duas ou três populações. No total foram 11 padrões, dos quais 7 foram partilhados por Nova Aliança, Birigui e Cassilândia. Dos 4 demais padrões, 2 foram partilhados por Nova Aliança e Birigui, um por Nova Aliança e Cassilândia e um por Birigui e Cassilândia. Paranaíba não apresentou padrões parcialmente comuns às outras populações analisadas.

McDonald *et al.* (1987) comentam em seu trabalho, que a falta de diferenciação, observada por eles, na comparação entre as populações de *Haematobia irritans*, tem sido descrita em outros parasitas e que as consequências genéticas de um estilo de vida parasítico são a homogeneidade intrapopulacional e a divergência interpopulacional, acrescentando ainda, que isto não ocorre em mosca-do-chifre, talvez porque os rebanhos (hospedeiros) são numerosos e móveis.





No presente trabalho, verificamos, porém, que a semelhança das populações quanto aos tipos de bandas não é acompanhada de identidade quanto às frequências dos padrões resultantes da combinação dessas bandas.

Como foi mencionado na INTRODUÇÃO, as esterases têm sido classificadas de acordo com a sensibilidade a diferentes inibidores, abrangendo organofosforados, reagentes de grupos sulfidrílicos, complementados pelo PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) e o NaF (fluoreto de sódio).

Nossos resultados com o uso de inibidores mostram que a EST 5, a banda mais fortemente corada e mais espessa encontrada em *Haematobia irritans*, foi completamente inibida pelo malathion e pelo sulfato de eserina, inibidores clássicos de colinesterases, e também em menor grau, pelo NaF. Esses resultados indicam que a banda esterásica EST 5 deve ser classificada como colinesterase, ou mais especificamente, como acetilcolinesterase (E.C.3.1.1.7). Esta enzima apresenta um perfil eletroforético e um padrão de inibição semelhantes aos observados em outros insetos já estudados em nosso laboratório, como por exemplo, em duas espécies de *Drosophila*, *D. mulleri* e *D. arizonensis* (Ceron, 1988) e *Megaselia scalaris* (Coelho-Rits, em andamento). Esses resultados reforçam a idéia de que esta enzima seja bastante conservada em invertebrados (insetos, por exemplo) e vertebrados, do ponto de vista de sua estrutura molecular, como indicado por alguns trabalhos. Sussman *et al.*, (1991) relataram a existência de várias formas oligoméricas da acetilcolinesterase em dois gêneros distintos de peixes-elétricos: *Electrophorus* e *Torpedo*, que são estruturalmente homólogas nos nervos e músculos dos vertebrados. Em *Drosophila*, o gene que codifica para esta enzima foi clonado e o sequenciamento dos clones de DNAc correspondentes, tornou possível identificar a estrutura deste gene devido à sua grande homologia com o gene que codifica para a mesma enzima em *Torpedo californica* (Fournier *et al.*, 1988). Zhu & Clark (1994) purificaram e determinaram a sequência de aminoácidos da acetilcolinesterase do besouro *Leptinotarsa decemlineata*. Quando esses autores compararam a sequência de aminoácidos desta enzima com a da acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster*, verificaram uma alta semelhança entre os tipos e as frequências dos aminoácidos nas duas enzimas. Em particular, o conteúdo dos aminoácidos acídicos (ácido aspártico e ácido glutâmico) e básicos (arginina, histidina e lisina) foram idênticos entre essas



enzimas, indicando também, uma alta homologia entre os genes que codificam para estas acetilcolinesterases.

Nos insetos, somente um gene codifica para a acetilcolinesterase e sua proteína está restrita ao sistema nervoso central. Esta enzima possui uma única forma molecular, constituída por um dímero glicosilado ligado à membrana por um glicolípido-âncora (Fournier *et al.*, 1993). A deficiência e a inibição desta enzima causa morte, devido à sua importante função nas terminações nervosas (finalizar a sinapse através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina). Esta propriedade tem sido utilizada na produção de inseticidas que inibem a acetilcolinesterase e são utilizados no controle dos insetos. Outra característica importante desta enzima, nos insetos, reside em sua estrutura. Ela é formada por uma estrutura dimérica de 150 KDa, cada subunidade possui 75 KDa e, por sua vez, é constituída por dois polipeptídeos de 55 e 18 KDa. O polipeptídeo de 55 KDa contém o sítio ativo portador da serina, o glicolípido-âncora responsável pela ligação à membrana, e a cisteína, envolvida com a dimerização (Fournier *et al.*, 1992). Em *Drosophila*, um único gene, localizado no loco *Ace*, codifica para esta enzima (Oakeshott *et al.*, 1993). Experimentos de hibridização de clones do loco *Ace* com diferentes cromossomos localizaram este gene no sítio 87E3 do cromossomo politênico IIIR. Alguns estudos demonstraram que a acetilcolinesterase hidrolisa preferencialmente substratos formados por ésteres de naftil (naftil acetato) *in vitro*, e o seu substrato *in vivo* é o neurotransmissor acetilcolina (Spierer *et al.*, 1983 apud Oakeshott *et al.*, 1993).

A alta frequência com que a enzima EST 5 foi encontrada nas quatro populações de *Haematobia irritans*, analisadas no presente trabalho, a espessura desta banda, sua intensidade de coloração, sua preferência pelo  $\alpha$ -naftil acetato e a não detecção de variantes eletroforéticas, reforçam a importância fisiológica desta enzima e sua classificação como acetilcolinesterase.

Como já mencionado, a acetilcolinesterase é uma enzima alvo no controle dos insetos por inseticidas. Alguns trabalhos têm relacionado o aumento dos níveis desta enzima em linhagens resistentes (Fournier *et al.*, 1988; 1993; Raymond *et al.*, 1993 e Kelly *et al.*, 1994). Em *Culex pipiens*, Bonning *et al.* (1991) compararam, por resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida, uma população da Itália, antes e depois de adquirida resistência aos inseticidas organofosforado e carbamato. Esses autores verificaram que, uma acetilcolinesterase predominante na população em fase



anterior (A1), foi substituída por duas acetilcolinesterases após o desenvolvimento de resistência (A2 e B2), presentes em altas frequências.

Nossos resultados mostram que a banda correspondente à acetilcolinesterase (EST 5) na população de Paranaíba, apresentou-se menos corada e mais delgada do que nas outras populações. Esta amostra não havia sido submetida a um controle prévio por inseticidas até a data da coleta, pelos motivos já citados. As outras três populações, que já haviam passado por um controle com diferentes tipos de inseticidas piretróides e organofosforados, apresentaram a banda esterásica EST 5 mais corada e mais espessa. Este fato poderia indicar uma adaptação dessas populações a um ambiente tóxico, onde, um aumento na produção desta acetilcolinesterase aumentaria a metabolização e, conseqüentemente, a desintoxicação dos inseticidas. Entretanto, essa afirmação deve ser tomada com cautela, dado o tamanho da amostra proveniente de Paranaíba, já referido, e que dados mais consistentes só seriam obtidos dosando-se diretamente os níveis de atividade desta enzima em populações submetidas e não-submetidas ao controle com inseticidas.

Quanto às demais esterases detectadas no presente trabalho, observamos que o PMSF inibiu completamente as bandas EST 1, EST 2, EST 3 e EST 4. Como já salientado, esse composto é considerado um inibidor de serino-esterases, o que sugere que estas enzimas pertençam a esta classe. Além disso, o padrão de inibição da banda EST 1 e EST 2 também foi semelhante com relação à inibição pelo NaF, pelo malathion (inibição total) e ambas foram parcialmente resistentes ao sulfato de eserina. Esses dados poderiam indicar que estas enzimas sejam carboxilesterases.

As esterases EST 3 e EST 4 não foram totalmente inibidas pelo malathion e nem pelo sulfato de eserina, e se mostraram resistentes aos reagentes sulfidrílicos. Esses fatos, aliados aos dados de inibição pelo PMSF, sugerem que essas enzimas possam ser acetilesterases. Além das esterases EST 3 e EST 4, já mencionadas, observamos também que as demais bandas de *Haematobia irritans* mostraram-se resistentes aos reagentes sulfidrílicos utilizados no presente trabalho. Isto sugere que, entre as esterases desta espécie, nenhuma pode ser classificada como arilesterase. Esses resultados estão de acordo com Healy *et al.* (1991). As 22 bandas esterásicas, descritas por esses autores em *D. melanogaster*, foram classificadas com base no padrão de inibição por diferentes compostos: os organofosforados paraoxon e o DFP (diisopropilfluorofosfato), dois reagentes sulfidrílicos (pCMB e





pOHMB) e o sulfato de eserina. Em seus resultados, Healy e seus colaboradores (opus cit), classificaram 10 esterases como sendo carboxilesterases, 6 como colinesterases e 3 como acetilesterases. Contudo, 3 enzimas não puderam ser classificadas devido à falta de resultados consistentes e, da mesma forma que em *H. irritans*, nenhum membro da classe das arilesterases foi detectado.

Dois resultados merecem, ainda, alguns comentários. Todas as bandas esterásicas de *H. irritans* foram completamente inibidas pelo beta-mercaptoetanol na concentração de 10mM. Este composto, nesta concentração, tem sido utilizado para melhorar a resolução do padrão de bandas esterásicas em alguns insetos. Entretanto, no nosso caso, o efeito foi contrário. Essa observação poderia indicar que o beta-mercaptoetanol na concentração utilizada desnaturou completamente essas enzimas. Na concentração de 0,1 mM este composto não apresentou nenhum efeito, reforçando a conclusão de que *H. irritans* não apresenta arilesterases. Além disso, os resultados obtidos com o sulfato de cobre corroboram a mesma conclusão.

Com relação ao Triton X-100, trata-se de um detergente não-iônico, utilizado na concentração de 0.2 a 1% para solubilizar as esterases ligadas a sistemas de membranas, melhorando a resolução e a identificação das bandas esterásicas (Healy *et al.*, 1991; Fournier *et al.*, 1992 e Argentine & James, 1995). No presente trabalho, este composto, na concentração de 1% não contribuiu para a melhora da resolução das enzimas esterásicas, quando adicionado ao tampão de amostra, no qual as moscas eram maceradas, e nem quando foi adicionado ao sistema de coloração.

Um aprofundamento do conhecimento das esterases de *Haematobia irritans* vai depender da análise de novas amostras de populações longamente expostas ao controle por inseticidas e de outras abordagens bioquímicas.

Segundo McDowell & Prakash (1976) uma das mais importantes questões da biologia evolutiva reside na quantidade de variação genética que existe nas populações, qual é o seu significado e como ela é mantida nas populações naturais. Muitos trabalhos têm se voltado ao estudo de polimorfismos genéticos em diferentes populações e espécies e às modificações na sequência de aminoácidos das proteínas e enzimas ao longo da evolução, evidenciando a grande quantidade de variação genética existente nessas populações. Tem sido reconhecido que o procedimento





eletroforético não detecta uma porção considerável dessa variação, pois, em alguns locos altamente variáveis, os produtos enzimáticos de diversos alelos diferentes possuem mobilidade eletroforética similar (Futuyma, 1992). É inegável, porém, que os estudos bioquímicos, como as técnicas de eletroforese, têm fornecido dados valiosos a respeito da variação genética nas populações (Lewontin & Hubby, 1966) e têm sido importantes para o progresso do entendimento da natureza e extensão do significado adaptativo das diferenças entre as variantes eletroforéticas (Danford & Beardmore, 1978). Procedimentos mais sensíveis, como o sequenciamento do DNA devem fornecer a complementação necessária para que, ao longo do tempo, seja possível conhecer melhor as questões relacionadas à variabilidade e à diferenciação das populações.

Também, diferentemente de outras espécies de moscas, nas quais as bandas esterísticas exibem afinidade ao  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetatos, as esterases de *Haemaphysalis irritans* parecem ser de um único tipo, porque todas elas hidrolisam preferencialmente o  $\alpha$ -naftil

As quatro populações examinadas são muito semelhantes com relação às suas bandas esterísticas, diferenciado somente pela EST 2, que foi exclusivamente encontrada em machos de Paranaíba, e a banda EST 1, encontrada em machos e fêmeas da mesma população. Assim, a EST 2 parece ser uma esterase macho-específica nesta população, como foi descrito em algumas espécies de *Drosophila*, onde tais tipos de esterases estão relacionadas com a reprodução.

O estudo do padrão de esterases resultante da combinação das bandas esterísticas em cada indivíduo, mostrou um total de 34 padrões. Considerando somente os padrões envolvendo bandas compartilhadas pelas quatro populações, observamos que: (1) há uma diferença significativa nas frequências de machos e fêmeas em cada população, exceto Paranaíba. (2) há uma diferença significativa na comparação entre machos nas quatro populações e entre fêmeas em todas as comparações, exceto entre Birigui e Nova Aliança. (3) também há uma diferença significativa em todas as comparações de frequências dos padrões de machos e fêmeas agrupados, exceto na comparação entre Birigui e Nova Aliança.

Estes dados mostram que, mesmo considerando as bandas partilhadas pelas quatro populações, estas diferem nas frequências de seus padrões e, assim, as quatro populações não são

## V. RESUMO E CONCLUSÕES

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para estudar o padrão de esterases em quatro populações naturais de *Haematobia irritans* (mosca-do-chifre). No total, 655 machos e fêmeas adultos foram analisados.

Os zimogramas obtidos mostraram oito bandas esterásicas nesta espécie. Este número pode ser considerado pequeno quando comparado com moscas de outros gêneros, tais como a *Drosophila*, a qual tem sido intensivamente estudada. O número reduzido de variantes esterásicas em *Haematobia irritans* pode ser atribuído ao seu estilo de vida parasítico e a dependência de sangue para alimentação.

Também, diferentemente de outras espécies de moscas, nas quais as bandas esterásicas exibem afinidade ao  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetatos, as esterases de *Haematobia irritans* parecem ser de um único tipo, porque todas elas hidrolisam preferencialmente o  $\alpha$ -naftil.

As quatro populações examinadas são muito semelhantes com relação às suas bandas esterásicas, diferindo somente pela EST 2, que foi exclusivamente encontrada em machos de Paranaíba, e a banda EST 7, encontrada em machos e fêmeas da mesma população. Assim, a EST 2 parece ser uma esterase macho-específica nesta população, como foi descrito em algumas espécies de *Drosophila*, onde tais tipos de esterases estão relacionadas com a reprodução.

O estudo do padrão de esterases resultante da combinação das bandas esterásicas em cada indivíduo, mostrou um total de 34 padrões. Considerando somente os padrões envolvendo bandas compartilhadas pelas quatro populações, observamos que: (1) há uma diferença significativa nas frequências de machos e fêmeas em cada população, exceto Paranaíba. (2) há uma diferença significativa na comparação entre machos nas quatro populações e entre fêmeas em todas as comparações, exceto entre Birigui e Nova Aliança. (3) também há uma diferença significativa em todas as comparações de frequências dos padrões de machos e fêmeas agrupados, exceto na comparação entre Birigui e Nova Aliança.

Estes dados mostraram que, mesmo considerando as bandas partilhadas pelas quatro populações, estas diferem nas frequências de seus padrões e, assim, as quatro populações não são





iguais. Nova Aliança e Birigui são mais semelhantes entre si, do que com as outras populações analisadas.

Foram utilizados inibidores na tentativa de classificar as esterases detectadas em *Haematobia irritans*, conforme sua natureza bioquímica. A banda EST 5, a mais fortemente corada e a mais espessa, foi completamente inibida pelo malathion e pelo sulfato de eserina, os inibidores usuais de colinesterases. Similarmente ao perfil eletroforético exibido por outros insetos, a banda esterásica EST 5 pode ser classificada como uma colinesterase. Esta enzima é alvo no controle por inseticidas dos insetos em geral. Como mencionado na literatura, colinesterases mostram um aumento de quantidade em linhagens de insetos resistentes.

No presente estudo, a amostra proveniente de Paranaíba, a única entre as populações estudadas que não havia sido submetida ao controle por inseticidas até a data da coleta, apresentou a banda EST 5 menos corada e mais delgada do que as outras populações.

As bandas esterásicas EST 1 a EST 4 foram completamente inibidas pelo PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), sugerindo que elas sejam serino-esterases. Foram também obtidas algumas indicações de que a EST 1 e a EST 2 são carboxilesterases. Nenhuma arilesterase foi detectada, nos nossos experimentos, em *Haematobia irritans*. Esta classe de esterases também não foi descrita em outros gêneros de moscas, como *Drosophila*.

The study of esterase patterns resulting from combining the esterase bands in each individual showed a total of 34 patterns. Considering only the patterns involving bands shared by the four populations, we observed that: (1) there is significant difference of frequency between males and females in every population except Paranaíba. (2) there is significant difference in the comparison of males among the four populations and of females in every comparison except between Birigui and Nova Aliança. (3) there is also significant difference in every comparison of frequencies of the patterns of males and females grouped except in the comparison between Birigui and Nova Aliança.

These data showed that, even considering the bands shared by the four populations they differ as to the frequencies of their patterns and thus the four populations are not alike. Nova Aliança and Birigui are more similar to each other than to the other populations analyzed.



## VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Polyacrilamide gel electrophoresis was used to study the esterase patterns in four natural populations of *Haematobia irritans* (horn fly). A total of 655 male and female adults flies were analyzed.

The zymogramms obtained showed eight esterase bands in this species. This may be considered a low number when compared to flies from other genera such as *Drosophila*, that have been intensively studied. The reduced number of esterase variants of *Haematobia irritans* was attributed to their parasitic behaviour and blood-dependence for food.

Also, unlike other fly species whose esterase bands exhibit affinity to  $\alpha$  and  $\beta$ -naphthyl acetates, the esterases in *Haematobia irritans* seem to be of a single kind because all of them hydrolyze preferentially  $\alpha$ -naphthyl.

The four populations examined are very similar as to their esterase bands, differing only by EST 2 that was exclusively found in males from Paranaíba and EST 7, found in both males and females of the same population. Thus, the EST 2 seems to be a male-specific esterase in that population, as has been described in some *Drosophila* species where such esterases are related to reproduction.

The study of esterase patterns resulting from combining the esterase bands in each individual showed a total of 34 patterns. Considering only the patterns involving bands shared by the four populations, we observed that: (1) there is significant difference of frequency between males and females in every population except Paranaíba. (2) there is significant difference in the comparison of males among the four populations and of females in every comparison except between Birigui and Nova Aliança. (3) there is also significant difference in every comparison of frequencies of the patterns of males and females grouped except in the comparison between Birigui and Nova Aliança.

These data showed that, even considering the bands shared by the four populations they differ as to the frequencies of their patterns and thus the four populations are not alike. Nova Aliança and Birigui are more similar to each other than to the other populations analyzed.





**VII. REFERENCES** Inhibitors used in an attempt to classify the esterases detected in *Haematobia irritans* as to their biochemical nature showed that the EST 5, the strongest stained and thickest band, is completely inhibited by malathion and eserine sulfate, the usual inhibitors of cholinesterases. Similarly to the electrophoretic profile exhibited by other insects, esterase band EST 5 may be classified as a cholinesterase. This enzyme is a target in the insecticide control of insects in general. As mentioned in literature, cholinesterases also shows increased amount in resistant insects strains.

In the present study, the sample from Paranaíba, the only one among the populations studied that was not submitted to insecticide control at the time of analysis, showed the esterase band EST 5 less stained and a little smaller than in the remaining populations.

Esterase bands EST 1 to EST 4 were completely inhibited by PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), suggesting that they are serine esterases. We also obtained some indications that EST 1 and EST 2 are carboxylesterases. Arylesterases were not detected by our experiments in *Haematobia irritans*. This class of esterases also was not described in flies of other genera, such as *Drosophila*.

- N, F.M. Esterase variations in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, v. 51, p. 212-220, 1964.
- BITONDI, M.M.G., MESTRINER, M.A. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. *Biochem. Genet.*, v. 21, n. 9-10, p. 985-1002, 1983.
- BLUME, R.R., KUNZ, S.E., HOGAN, B.F., MATTER, J.J. Biological and ecological investigations of horn flies in central Texas: Influence of other insects in cattle manure. *J. Econ. Entomol.*, v. 63, p. 1121-1123, 1970.
- 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. *Bulletin of Entomological Research*, v. 81, p. 5-10, 1991.
- BRADLEY, J.U., SONYA, N.M., CHEN, J. Inhibition of neurally mediated nonadrenergic, noncholinergic contractions of guinea pig bronchus by isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 271, n. 2, 1994.



## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- ARNASON, E. An experimental study of neutrality at the malic dehydrogenase and EST-5 loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Hereditas*, v. 96, p. 13-27, 1982.
- BARKER, J.S.F. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase-2 in two populations of *Drosophila buzzatii*. *Genetica*, v. 92, p. 165-175, 1994.
- BARNES, J.M., VERSCHOYLE, R.D. Toxicity of a new pyrethroid insecticide. *Nature*, v. 248, p. 711, 1974.
- BECKMAN, L., JOHNSON, F.M. Esterase variations in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, v. 51, p. 212-220, 1964.
- BITONDI, M.M.G., MESTRINER, M.A. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. *Biochem. Genet.*, v. 21, n. 9-10, p. 985-1002, 1983.
- BLUME, R.R., KUNZ, S.E., HOGAN, B.F., MATTER, J.J. Biological and ecological investigations of horn flies in central Texas: Influence of other insects in cattle manure. *J. Econ. Entomol.*, v. 63, p. 1121-1123, 1970.
- 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. *Bulletin of Entomological Research*, v. 81, p. 5-10, 1991.
- BRADLEY, J.U., SONYA, N.M., CHEN, J. Inhibition of neurally mediated nonadrenergic, noncholinergic contractions of guinea pig bronchus by isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 271, n. 2, 1994.





- BRADY, J.P., RICHMOND, R.C. An evolutionary model for the duplication and divergence of esterase genes in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, v. 34, p. 506-521, 1992.
- BRADY, J.P., RICHMOND, R.C., OAKESHOTT, J.G. Cloning of the esterase-5 locus from *Drosophila pseudoobscura* and comparison with its homologue in *D. melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 7, p. 525-546, 1990.
- BRISABOLS, A., GOULLET, P. Isolation and characterization of carboxylesterase E3 from *Salmonella enterica*. *J. App. Bacteriol.*, v. 75, p. 176-183, 1993.
- BURT, P.E., GOODCHILD, R.E. The site of action of pyrethrin I in the nervous system of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Entomol. Exp. Appl.*, v. 14, p. 179-189, 1971a.
- BURT, P.E., GOODCHILD, R.E. The spread of topically-applied pyrethrin I from the cuticle to the central nervous system of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Entomol. Exp. Appl.*, v. 14, p. 255-269, 1971b.
- BYFORD, R.L., CRAIG, M.E., CROSBY, B.L. A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *J. Anim. Sci.*, v. 70, p. 597-602, 1992.
- CAMPBELL, J.B. Effect of horn fly control on cows as expressed by increased weights of calves. *J. Econ. Entomol.*, v. 69, p. 711, 1976.
- CAMPBELL, J.B. The history, biology, economics and control of the horn fly, *Haematobia irritans*. *Agric-Pratice*, v. 13, n. 4, p. 31-35, 1992.
- CAMPBELL, J.B., THOMAS, G.D. The history, biology, economics and control of the horn fly, *Haematobia irritans*. *Agri-practice.*, v. 13, n. 4, p. 31-36, 1992.
- CARRASCO, C.E., PIREZ-CHIESA, Y., BRUCK, D. The esterases of *D. dunni*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 79B, n. 3, p. 375-378, 1984.
- CERON, C.R. Padrão de esterases no desenvolvimento de *D. 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 a embroidering hoop. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 15, n. 01, p. 201-203, 1992.





- COATS, J.R. Structure- activity relationships in DDT Analogs. In: COATS, J.R.- **Insecticide mode of action**. New York: Academic Press, 1982. cap. 2, p. 29-41.
- COATS, P.M., MESTRINER, M.A., HOPKINSON, D.A. A preliminary genetic interpretation of the esterase isozymes of human tissues. **Ann. Hum. Genet.**, v. 39, p. 1-20, 1975.
- COOBS, G. Polymorphism for dimerizing ability at the esterase-5 locus in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics.**, v. 82, p. 53-62, 1976.
- 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.
- CONSTANT, R., THOMPSON, M., SHOTKOSKI, F. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **FEBS LETTERS**, v. 325, n. 3, p. 187-190, 1993.
- 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. Disc electrophoresis: Methods and applications to serum proteins. **Annals 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., WASSMER, B. Genetic characterization of esterase-28 (ES-28) of the mouse. **Biochem. Genetic**, v. 29, n. 1/2, p. 55-64, 1991.
- De KORT C.A.D., WIETEN, M., KRAMER, S.J. The occurrence of juvenile hormone specific esterases in insects. A comparative study. **Proc. Akad. Wet.**, v. 82, p. 325-331, 1979.
- DEVONSHIRE, A.L. The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid 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 organophosphorous, 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 RNAm for carboxylesterase in insecticide-susceptible and resistant *Myzus persicae*. *Insect Biochem. J.*, v. 16, p. 659-665, 1986.
- DEVONSHIRE, A.L., WILLIAMSON, M.S., MOORES, G.D., FIELD, L.M. Analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem. J.*, v. 294, p. 569-574, 1993.
- DRUMMOND, R.O. Economic aspects of ectoparasites of cattle in North America. *Symp. XXIII World Vet. Congress.*, 1987.
- DRUMMOND, R.O., GEORGE, J.E., KUNZ, S.E. Control of arthropod pests of livestock: a review of technology. *CRC. Press, Boca Raton, Fla.*, p. 245, 1988.
- DRUMMOND, R.O., LAMBERT, G., SMALLEY, H.E., TERRILL, S.E. Estimated losses of livestock to pests. *CRC. Press, Boca Raton, FL*, 1981.
- DUFER, J., TRENTESAUX, C., DESPLACES, A. Differential effect of the serine protease inhibitor phenyl methyl sulfonyl fluoride on cytochemically detectable esterases in human leucocytes and platelets. *Scand. J. Haematol.*, v. 32, p. 25-32, 1984.
- ELLIOTT, M. Established pyrethroid insecticides. *Pestic. Sci.*, v. 11, p. 119-128, 1980.
- ESSIG, H.W., PUND, W.A. Horn fly control in beef cattle. *Mississippi Agri. Exp. Sta. Bull.*, p. 707, 1965.
- FARMER, J.L., CARTER, M.W. Properties of partially purified allozymes of esterase-5 of *Drosophila pseudoobscura*. *Camp. Biochem. Physiol.*, v. 93B, n. 2, p. 451-458, 1989.
- FIELD, L. M., DEVONSHIRE, A.L., FORDE, B.G. Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids results from amplification of an esterase gene. *Biochem J.*, v. 251, p. 309-312, 1988.
- FINCHER, G.T., MORGAN, P.B. Flies affecting livestock and poultry. *South. Coop. Ser. Bull.*, p. 149-155, 1990.





- FOURNIER, D., BERGE, J.B., CARDOSO, A.M.L., BORDIER, C. Acetylcholinesterase from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to membranes by a glycopospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase. *J. Neurochem.*, v. 50, p. 1158-1163, 1988.
- FOURNIER, D., CUANY, A., BRIDE J.M., BERGE, J.B. Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult house flies *Musca domestica*. *J. Neurochem.*, v. 50, p. 1455-1461, 1987.
- FOURNIER, D., MUTERO, A., PRALAVORIO, M., MARC, J. *Drosophila* acetylcholinesterase: mechanism of resistance to organophosphates. *Chem. Biol. Interaction*, v. 87, p. 233-238, 1993.
- FOURNIER, D., MUTERO, A., RUNGGER, D. *Drosophila* acetylcholinesterase: Expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.*, v. 203, 513-519, 1992.
- FUTUYMA, D.J. Variação. In: FUTUYMA, D.J. *Biologia evolutiva*. 2. ed. Ribeirão Preto: SBG/CNPq, 1992. cap. 4, p. 87-125.
- GAMMON, D.W. Neural effects of allethrin on the free-walking cockroach, *Periplaneta americana* (L.): an investigation using defined doses at 15° and 32°. *Pestic. Sci.*, v. 9, p. 79-91, 1978.
- GU, X., ZERA, J.A. Developmental profiles and characteristics of hemolymph juvenile hormone esterase, general esterase and juvenile hormone binding in the cricket, *Grillus assimilis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 107B, p. 553-560, 1994.
- GUIMARÃES, J. H. A. *Haematobia irritans* no Brasil, biologia, importância econômica e controle. I Simpósio Internacional da Mosca-do-Chifre, p. 17-19, 1983.
- HANZILICK, T.N., ABDEL, A.Y.A.I., HARSHMAN, L.G., HAMMOCK, B.D. Isolation and sequencing of cDNA clones coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 12, p. 12419-12425, 1989.
- HANZILICK, T.N., HAMMOCK, B.D. Characterization of juvenile hormone hydrolisis in early larval development of *Tricophusia ni*. *Arch. Insect. Bioch. & Physiol.*, v. 9, p. 135-156, 1988.
- HARRIS, R.L. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, v. 164, p. 298-310, 1966.
- HARRIS, R.L., MILLER, J.A., FRAZAR, E.D. Horn flies and stable flies: feeding activity. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 67, p. 891-894, 1974.





- HARSHMAN, L.G., WARD, V.K., BEETHAM, J.K., GRANT, D.F., GRAHAN, L.J. ZRAKET, C.A., HEICKE, D.G., HAMMOCK, B.D. Cloning, characterization, and genetics of the juvenile hormone esterase gene from *Heliothis virescens*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 24, n. 7, p. 671-676, 1994.
- HARVEY, T.L., BRETHOUR, J.R. Effect of horn flies on weight gains of beef cattle. **J. Econ. Entomol.**, v. 73, p. 516-518, 1979.
- HARVEY, T.L., LAUNCHBAUGH, J.L. Effect of horn flies on behavior of cattle. **J. Econ. Entomol.**, v. 75, p. 25-27, 1982.
- HAUFE, W.O. Growth of range cattle protected from horn flies (*Haematobia irritans*) by ear tags impregnated with fenvalerate. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 62, p. 567, 1982.
- HEALY, M.J., DUMANCIC, M.M., OAKESHOTT, J.G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genetics**, v. 29, n. 7/8, p. 365-388, 1991.
- HEYMANN, E. Carboxylesterases and amidases. In: **Enzymatic Basis of Detoxication**. New York: Academic Press, 1980, v. II, p. 291-323.
- HIDAYAT, P., GOODMAN, W.G. Juvenile hormone and hemolymph juvenile hormone binding protein titers and their interaction in the hemolymph of fourth stadium *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 24, n. 7, p. 709-715, 1994.
- 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. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 109A, p. 285-291, 1994.
- HOJRING, N., SVENSMARK, O. Molecular and catalytic of a butyryl esterase from human red cells brain. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 481, p. 351-358, 1987.
- HOLMES, R.S., MASTERS, C.J. The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 132, p. 379-399, 1967.
- HUANG, Y.S., WOODS, L., SULTATOS, L.G. Solubilization and purification of A-esterase from mouse hepatic microsomes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, n. 6, p. 1273-1280, 1994.





- IVEY, M.C., MILLER, J.A., IVIE, G.W. Methoprene: residues in fat of cattle treated with methoprene boluses. *Ibid.*, v. 75, p. 254-256, 1982.
- JOHNSON, G. Importance of substrate variability to enzyme polymorphism. *Nature New Biology*, v. 243, p. 151-153, 1973.
- JOHNSON, F.N., KANAPI, C.G., RICHARDSON, R.H., WHEELER, M.R., STONE, W.S. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparasion. *Univ. Texas Publ.*, v. 6615, p. 517-532, 1966.
- JOHNSON, F.M., RICHARDSON, R.H., KAMBYSELLIS, M.P. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. III. qualitative comparasion of the esterases of *D. aldrichi* and *D. mulleri*. *Biochem. genet.*, v. 1, p. 239-247, 1968.
- JONES, B.R., BRANCOFT, H.R. Distribution and probable physiological role of esterases in reproductive, digestive and fat-body tissue of adult cotton boll weevil. *Anthonomus grandis*. *Boh. 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 *Trichopusia 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, *Trichopusia ni*. *J. Insect Physiol.*, v. 27, p. 85-91, 1981.
- JONES, D., JONES, G., WING, K.D., RUDNICK, A.M., HAMMOCK, B.D. Juvenile hormone estrsases of lepdoptera. I. Activity in the haemolymph 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'MAHONY, P., TURNER, H. Structure, expression and gene sequence of a juvenile hormone esterase-related protein from metamorphosing larvae of *Trichopusia ni*. *Biochem. J.*, v. 302, p. 827-835, 1994.
- JUNGE, W., KRISCH, K. The carboxylesterases/amidases of mammalian liver and their possible significance. *C.R.C. Critical Rev. Toxicol.*, v. 3, p. 371-434, 1975.





- JUNGE, W. Carboxylesterase. In: BERGMAYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3. ed. Florida: Verlag Chemie, 1984. v. II, cap. 1.1, p. 2-14.
- JUNGE, W. Human microsomal carboxylesterase. Distribution in several tissues and some preliminary observations on its appearance in serum. **Enzymes in Health and Disease**, p. 54-58, 1981.
- KAMBYSELIS, M.P., JOHNSON, F.M., RICHARDSON, R.H. Isoenzyme variability in species of the genus *Drosophila*. IV. Distribution of the esterases in body tissues of *D. aldrichi* and *D. mulleri* adults. **Biochem. Genetic.**, v. 1, p. 249-265, 1968.
- KAO, L.R., MOTOYAMA, M., DAUTERMAN, W.C. Studies on hydrolases in various house fly strains and their role in malathion resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology.**, v. 22, p. 86-92, 1985a.
- KAO, L.R., MOTOYAMA, M., DAUTERMAN, W.C. The purification and characterization of esterases from insecticide-resistant and susceptible house flies. **Pesticide Biochemistry and Physiol.**, v. 23, p. 238-239, 1985b.
- KAPIN, M.A., AHMAD, S. Esterases in larval tissues of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): Optimum assay conditions, quantification and characterization. **Insect Biochem.**, v. 10, p. 331-337, 1980.
- 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.
- 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.
- KELLY, S.S., MUTCH, E., WILLIAMS, F.M., BLAIN, P.G. Electrophysiological and biochemical effects following single doses of organophosphates in the mouse. **Arch. Toxicol.**, v. 68, p. 459-466, 1994.
- 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.
- KING, J.L., JULES, T.L. Resistance in insecticide associated of point mutations. **Science**, v. 164, p. 788-798, 1969.





- KORT, C.A.D., GRANGER, N.A. Regulation of the juvenile hormone titer. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 26, p. 1-28, 1981.
- KUNZ, S.E., BLUME, R.R., HOGAN, B.F., MATTER, J.J. Biological and Ecological Investigation of Horn Flies in Central Texas: Influence of time of Manure Deposition on Oviposition. *Journal of Economic Entomology*, v. 63, p. 930-933, 1970.
- KUNZ, S.E., MILLER, J.A., SIMS, P.L. MEYERHOEFFER, D.C. Economics of controlling horn flies (Diptera: Muscidae) in range cattle management. *J. Econ. Entomol.*, v. 77, p. 657, 1984.
- LAAKE, E.W. DDT for the control of the horn fly in Kansas. *J. Econ. Entomol.*, v. 39, p. 65-68, 1946.
- LABATE, B., GAME, Y., COOKE, H., OAKESHOTT, J.G. The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, v. 63, p. 203-208, 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAPENTA, A.S. **Padrões de esterases na superespécie *D. serido* e em *D. buzzatii***. São José do Rio Preto, 1992. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.
- 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.
- LEWONTIN, R.C., HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *D. pseudoobscura*. *Genetics*, v. 54, p. 595-609, 1966.
- LITH, H.A., BIEMAN, M., ZUTPHEN, B.F.M. Purification and molecular properties of rabbit liver esterase ES-1A. *Eur. J. Biochem.*, v. 184, p. 545-551, 1989.
- LUTHY, P. Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 8, p. 1-7, 1980.
- MACKNESS, M.I., WALKER, C.H., ROWLANDS, D.G., PRICE, N.R. Esterase activity in homogenates of three strains of rust red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 740, n. 1, p. 65-68, 1983.





- MAGGIA, L., PRIN, Y., PICARD, B., GOULLET, P. Esterase diversity among 46 *Frankia* strains isolated from *Casuarina equisetifolia* in West Africa. *Can. J. Microbiol.*, v. 39, p. 709-714, 1993.
- 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, 1983.
- MANGANARIS, A.G., ALSTON, F.H. Genetics of esterase isoenzymes in *Malus*. *Theor. Appl. Genet.*, v. 83, p. 467-475, 1992.
- MARUYAMA, Y., YASUTOMI, K., OGITA, Z.I. Electrophoretic analysis of esterase isozymes in organophosphate-resistant mosquitoes (*Culex pipiens*). *Insect Biochem.*, v. 14, n. 2, p. 181-188, 1984.
- MASTROPAOLO, W., YOURNO, J. An ultraviolet spectrophotometric assay for  $\alpha$ -naphthyl acetate and  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterases. *Analytical Biochemistry*, v. 115, p. 188-193, 1981.
- MCDONALD, P.T., HILBURN, L.R., KUNZ, S.E. Genetic similarities among natural populations of the horn fly. *Annals Entomol. Soc. America*, v. 80, n. 2, p. 288-292, 1987.
- MCDOWELL, R.E., PRAKASH, S. Allelic heterogeneity within allozymes separated by electrophoresis in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 73, n. 11, p. 4150-4153, 1976.
- McREYNOLDS, M.S. Homologous esterases in three species of the virilis group of *Drosophila*. *Genetics*, v. 56, p. 527-540, 1967.
- MILLER, S., NOVAK, R. A comparative study of esterases in two strains of anopheline mosquitoes by isoelectric focusing. *Int. J. Biochem.*, v. 15, n. 12, p. 1409-1415, 1983.
- MORETTO, A., BERTOLAZZI, M., LOTTI, M. The phosphorothioic acid o-o-ethyl-s-propyl-ester exacerbat es organophosphate polyneuropathy without inhibition of neuropathy target esterase. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, v. 129, p. 133-137, 1994.
- MORGAN, E.W., YAN, B., GREENWAY, D., PETERSEN, D.R., PARKINSON, A. Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (Hydrolase A and B). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 315, n. 2, p. 495-512, 1994.





- MORTON, R.A., SINGH, R.S. The association between malathion resistance and acetylcholinesterase in *D. melanogaster*. **Biochem. Genetics**, v. 20, p. 179, 1982.
- MOTOYAMA, M., DAUTERMAN, W.C. The role of non-oxidative metabolism in organophosphorus resistance. **J. Agr. Food. Chem.**, v. 22, p. 350-355, 1974.
- MOUCHES, C., MAGNIN, M., BERGE, J.B., DE SILVESTRI, M., BEYSSAT, V., PASTEUR, N., GEORGHIOU, G.P. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Cules* mosquitoes and their presence in other insects. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 2113-2116, 1987.
- MOUCHES, 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.
- MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J.M., FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 5922-5926, 1994.
- MYERS, M.A., HEALY, M.J., OAKESHOTT, J.G. Effects of the residue adjacent to the reactive serine on the substrate interactions of *Drosophila* esterase-6. **Biochemical Genetics**, v. 31, n. 718, p. 259-278, 1993.
- MYERS, M. A., RICHMOND, R.C., OAKESHOTT, J.G. On the origins of esterases. **Mol. Biol. Evol.**, v. 5, n. 2, p. 113-119, 1988.
- NANYA, O. S. Estudo de cromossomos politénicos e de síntese protéica sob efeito de choques de temperatura, em *D. mulleri*, *D. arizonensis* e híbridos. São José do Rio Preto, 1993. 130p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.
- NARISE, S., HUBBY, J.L. Purification of esterase-5 from *Drosophila pseudoobscura*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 122, p. 281, 1966.
- OAKESHOTT, J.G., PAPENRECHT, T.M., BOYCE, M.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**, v. 90, p. 239-268. 1993.





- POLYAKOVA, E.V., KOROCHKIN, L.I. Investigation of the spectrum of esterase isozymes in various species of *Drosophila* of the virilis group. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, v. 22, n. 3, p. 156-161, 1986.
- PRALAVORIO, M., FOURNIER, D. *Drosophila* acetylcholinesterase: characterization of different mutants resistant to insecticides. *Biochem. Genetics*, v. 30, n. 1/2, p. 77-83, 1991.
- RANSOM, B.H. The animal parasites of cattle. U.S. Dep. Agric., Bureau of Animal Industry. **Special Rep. on Diseases of Cattle.**, p. 496-497, 1908.
- RAUSCHENBACH, I.Y., LUKASHINA, N.S., KOROCHKIN, L.I. Role of pupal esterase in the regulation of the hormonal status in two *D. virilis* stocks differing in response to high temperature. *Develop. Genet.*, v. 22, p. 65-80, 1984.
- RAYMOND, M., BEYSSAT-ARNAOUTY, V., PASTEUR, N. Amplification of various esterase B's responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. *Biochem. Genetics*, v. 27, n. 7/8, 1989.
- RAYMOND, M., POULIN, E., BOIROUX, V., DUPONT, E., PASTEUR, N. Estability of insecticide resistance due amplification of esterase genes in *Culex pipiens*. *Heredity*, v. 70, 1993.
- RENUCCI, M., MARTIN, N., STRAMBI, C. Temporal variations of haemolymph esterase activity and juvenile hormone titers during ovocyte maturation in *Acheta domesticus*. *Gen. Comp. Endocr.*, v. 55, p. 480-487, 1984.
- RICHARDSON, R.H., SMOUSE, P.E., RICHARDSON, M.E. Pattern of molecular variation II. Associations of electrophoretic mobility and larval substrate within species of the *Drosophila mulleri* complex. *Genetics*, v. 85, p. 141-154, 1977.
- ROBBI, M., BEAUFAY, H. Cloning and sequencing of rat liver carboxylesterase ES-3 (Egasy). *Biochem. Bioph. Reserch Comunications.*, v. 203, n. 3, p. 1404-1411, 1994.
- ROTH, J.P., MACQUEEN, A., BAY, D.E. Effect of introduced scarab beetles (coleoptera: Scarabaeninae) on coprofilic insects in central queensland. *Environ. Entomol.*, v. 20, n. 3, p. 909-914, 1991.





- ROTIN, D., FEYEREISEN, R., KOENER, J., TOBE, S.S. Haemolymph juvenile hormone esterase activity during the reproductive cycle of the viviparous cockroach. *Diploptera punctata*. *Insect Biochem.*, v. 12, p. 263-268, 1982.
- SAHGAL, A., KUMAR, S., PILLAI, M.K.K. Microplate assay of evated activity in individual pyrethroid-resistant mosquitoes. *J. Biosci.*, v. 19, n. 2, p. 193-199, 1994.
- SANDERS, D.P., DOBSON, R.C. The insect complex associated with bovine manure in Indiana. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 59, p. 955-959, 1966.
- SCHREIBER, E.T., CAMPBELL, J.B., KUNZ, S.E., CLANTON, D.C., HUDSON, D.B. Effects of horn fly (Diptera: Muscidae) control on cows and gastrointestinal worm (Nematode: Trichostrongylidae) treatment for calves on cow and calf weight gains. *J. Econ. Entomol.*, v. 80, p. 451, 1987.
- SEBESTA, K., FARKAS, J., HORSKA, K. Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Academic Press, Inc. p. 249-281, 1981.
- SEKAR, V., HAGEMAN, J.H. Specificity of the serine protease inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride. *Biochem. Biophys. Research Communications.*, v. 89, n. 2, p. 474-478, 1979.
- SERGEEV, P., YENIKOLOPOV, G.N., PEUNOVA, N.I., KUZIN, B.A., KHECHUMIAN, R.B., KOROCHKIN, L.I., GEORGIEV, G.P. Regulation of tissue-specific expression of the esterase S gene in *D. virilis*. *Nucleic Acids Research*, v. 21, n. 15, p. 3545-3551, 1993.
- SIDELL, F.R. Clinical effects of organophosphorous cholinesterase inhibitors. *J. of Appl. Toxicol.*, v. 14, n. 2, p. 111-113, 1994.
- SMITH, G.V. Insect and others arthropods of medical importance. *Brit. Museum*, p. 251-269, 489, 1973a.
- SMITH, G.V. Studies on Australian Muscidae (Diptera). *J. Zool. Suppl. Ser.*, v. 21, 129-296, 1973b.
- SODERLUND, D.M., CASSIDA, J.E. Substrate specificity of mouse-liver microsomal enzymes in pyrethroid metabolism. *A.C.S. Symp. Ser.*, v. 42, p. 162-172, 1977a.
- SODERLUND, D.M., CASSIDA, J.E. Stereospecificity of pirethroid metabolism in mammals. *A.C.S. Symp. Ser.*, v. 42, p. 173-185, 1977b.





- SOREQ, H., SEIDMAN, S., DREYFUS, P.A., ZEVIN-SONKIN, D., ZAKUT, H. Expression and tissue-specific assembly of human butyrylcholine esterase in microinjected *Xenopus laevis* Oocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 18, p. 10608-10613, 1989.
- SPARKS, T.C., BYFORD, R.L., CRAIG, M.E., CROSBY, B.L., MCKENZIE, C. Permethrin metabolism in pyrethroid-resistant adults of the horn fly. *J. Econ. Entomol.*, v. 83, n. 3, p. 662-665, 1990.
- SPARKS, T.C., QUISENBERRY, S.S., LOCKWOOD, J.A., BYFORD, ROUSH, R.T. Insecticide resistance in the horn fly, *Haematobia irritans*. *J. Agric. Entomol.*, v. 2, p.217-233, 1985.
- 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.
- SUMMERLIN, J.W., BAY, D.E., HARRIS, R.L., RUSSELL, D.J., STAFFORD, K.C. Predation by four species of Histeridae (Coleoptera) on horn fly (Diptera: Muscidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 75, p. 675-677, 1982.
- SUMMERLIN, J.W., BAY, D.E., STAFFORD, K.C., HUNTER, J.S. Laboratory observations on the life cycle and habits of *Hister abbreviatus* (Coleoptera: Histeridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 77, p. 543-547, 1984.
- SUMMERLIN, J.W., FINCHER, G.T., ROTH, J.P. Predation by *atholus rothkirchi* on horn fly. *Southwest. Entomol.*, v. 15, p. 253-256, 1990.
- SUMMERLIN, J.W., ROTH, J.P., FINCHER, G.T. Competition and predation as mortality factors of the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), in a central Texas pasture habitat. *Environ. Entomol.*, v. 12, n. 1, p. 106-109, 1983.
- SUMMERLIN, J. W., ROTH, J.P., FINCHER, G.T. Suitability of irradiated or freeze-killed horn fly pupae as hosts for hymenopteran parasitoids. *J. Econom. Entomol.*, v. 84, n. 1, p. 94-98, 1991a.
- SUMMERLIN, J. W., ROTH, J.P., FINCHER, G.T. Predation by two species of histerid beetles on the horn fly. *Southwestern Entomol.*, v. 16, n. 1, p. 45-49, 1991b.





- SUSSMAN, J.L., HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L., SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, v. 253, p. 872-879, 1991.
- TEMEYER, K.B. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the Dipteran *Haematobia irritans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 5, p. 952-955, 1984.
- THOMAS, D.B. Influence of a juvenile hormone analog on reproduction of normal and sterilized adult horn flies (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 77, p. 666-669, 1984.
- THOMAS, C.D., MORGAN, C.E. Fields studies of the immature stages of the horn fly in Missouri. *Environ. Entomol.*, v. 4, p. 453-459, 1972.
- TIMMERMANS, M.Y.J., TEUCHY, H., KUPERS, L.P.M. The cDNA sequence encoding bovine pregastric esterase. *Gene*, v. 147, p. 259-262, 1994.
- TSUNO, K., AOTSUKA, K.T., OHBA, S. Further genetic variation at the esterase loci of *D. virilis*. *Biochem. Genet.*, v. 22, n. 3/4, p. 323-337, 1984.
- VENKATESH, K., CRAWFORD, C.L., ROE, R.M. Characterization and the developmental role of plasma juvenile hormone esterase in the adult cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.*, v. 18, n. 1, p. 53-61, 1988.
- 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. 53, n. 7, p. 543-551, 1989.
- WALKER, C.H. The classification of esterases which hydrolyse organophosphates: recent developments. *Chem. Biol. Interactions.*, v. 87, p. 17-24, 1993.
- WALKER, C.H., MACKNESS, M.I. Esterases: problems of identification and classification. *Bioch. Pharmacol.*, v. 32, n. 22, p. 3265-3269, 1983.
- WHITTAKER, M. Cholinesterase. In: BERGMAYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. 3. ed. Florida: Verlag Chemie, 1984. v. II, cap. 1.4, p. 52-74.
- WRIGHT, T.R.F., MCINTYRE, R. A homologous gene-enzyme system. Esterase-6 in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics*, v. 48, p. 1717-1726, 1963.





- YAN, B., YANG, D., BRADY, M., PARKINSON, A. Cloning, sequencing, cellular localization, and relationship to rat liver hydrolase. *The J. of Biological Chemistry and Molecular Biology*, v. 269, n. 47, p. 29688-29696, 1994.
- YONG, H.S. Allozyme variation in a dimeric esterase of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* from peninsular malaysia. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 83b, n. 4, p. 783-785, 1986.
- ZERA, A.J., TIEBEL, K.C. Differences in juvenile hormone esterase activity between presumptive macropterous and brachypterous *Gryllus rubens*: implications for the hormonal control of wing polymorphism. *J. Insect. Physiol.*, v. 35, n. 1, p. 7-77, 1989.
- ZERBA, E. N., CASABÉ, N. Esterases of *Triatoma infestans* and its relationship with the metabolism of organophosphorous insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 68, p. 255-258, 1980.
- ZERBA, E. N., WOOD, E. J., MALKENSON, N. C. 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.
- ZHU, Y.K., CLARK, J.M. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v. 24, n. 5, p. 453-461, 1994.



