

Adriana Pasqueto Nascimento

**Estudo dos Padrões de Esterases em
Quatro Espécies do Subgrupo
Saltans de Drosophila**



PATRICIA
223.3163

1910000908



Adriana Pasqueto Nascimento

**ESTUDO DOS PADRÕES DE ESTERASES EM
QUATRO ESPÉCIES DO SUBGRUPO *SALTANS*
DE *DROSOPHILA***



908/00

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

São José do Rio Preto - SP
2000

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, com auxílios da FAPESP e CAPES.

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

Agradecimentos

Ao término deste trabalho quero agradecer carinhosamente a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a sua concretização:

A Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela brilhante orientação deste trabalho, pelo carinho, confiança e dedicação,

Aos Professores Doutores Carlos Roberto Ceron e Marco Antonio Del Lama pela cuidadosa análise da pró-forma e pelas valiosas sugestões,

Ao Prof. Dr. José Antonio Manzato, pela colaboração na análise estatística,

A Profa. Dra. Ana Silvia Lapenta, pelo auxílio e estímulo durante o desenvolvimento desse trabalho,

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, com auxílios da FAPESP e CAPES.

Aos funcionários da Biblioteca, pelo auxílio prestado na consulta à bibliografia,

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção, atendimento e serviços prestados,

Ao Prof. Raul Aragão, Susy Mary G. Poiate e Suely Ceron, pelo carinho e amizade,

Ao João Marcos, José Ednardo, Marcelo, Sr. João e Dona Madalena, pelo apoio e pelos bons momentos de convivência,

Agradecimentos

Ao término deste trabalho quero agradecer carinhosamente a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a sua concretização:

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela brilhante orientação deste trabalho, pelo carinho, confiança e dedicação,

Aos Professores Doutores Carlos Roberto Ceron e Marco Antonio Del Lama pela cuidadosa análise da pró-forma e pelas valiosas sugestões,

Ao Prof. Dr. José Antonio Manzato, pela colaboração na análise estatística,

À Profa. Dra. Ana Sílvia Lapenta, pelo auxílio e estímulo durante o desenvolvimento desse trabalho,

Aos Professores do Departamento de Biologia deste Instituto, pelos conhecimentos e profissionalismo transmitidos,

Aos funcionários dos Departamentos de Biologia e de Química e Geociências, pela consideração e apoio,

Aos funcionários da Biblioteca, pelo auxílio prestado na consulta à bibliografia,

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção, atendimento e serviços prestados,

Ao Prof. Raul Aragão, Susy Mary G. Poiate e Suely Ceron, pelo carinho e amizade,

Ao João Marcos, José Eduardo, Marcelo, Sr. João e Dona Madalena, pelo apoio e pelos bons momentos de convivência,

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação deste Instituto, pela amizade e convivência,

Às minhas amigas e colegas de Pós-Graduação, Alessandra T. Laranja, Alessandra Bernardo, Ester Tartarotti, Rita de Cássia de Sousa, Thaísa V. G. Arakawa, Lilian C. Ruiz, pela grande amizade, carinho e pela palavra amiga nos momentos difíceis,

Aos meus pais, Antonio e Maura, pela brilhante educação e empenho na minha formação,

Aos meus irmãos Antonio, Alexandre e Mauro pelo carinho e amor,

Ao Elder, pela compreensão, carinho e incentivo,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pela concessão da Bolsa de Aperfeiçoamento e Mestrado,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo auxílio financeiro,

Enfim, a Deus por tudo.

Muito Obrigada.

"Vida devotada à atividade criadora em ciência é vida feliz. Nenhum outro modo de vida é igual ou superior em felicidade...Eu creio que o trabalho científico, juntamente com outras formas de trabalho criador, é o papel propulsor da evolução do espírito humano. A evolução do espírito humano dá significado à evolução humana e à evolução universal".

T. Dobzhansky

ÍNDICE

I-INTRODUÇÃO.....	1
II-MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
1-Linhagens e manutenção no laboratório.....	14
2-Estudo dos padrões de esterases.....	14
2.1-Técnica de eletroforese e preparo dos géis.....	16
3-Características das amostras analisadas.....	17
3.1-Amostras dos adultos.....	18
3.2-Amostras para estudo dos padrões no desenvolvimento.....	18
3.3-Casulos vazios de pupas.....	18
3.4-Amostras dos híbridos.....	18
4-Preparo das amostras.....	19
5-Tratamento dos géis para identificação das esterases.....	19
6-Uso de inibidores.....	20
7-Secagem dos géis.....	21
8-Avaliação do grau de atividade das bandas esterásicas nos géis.....	21
9-Análise estatística.....	21
III-RESULTADOS.....	21
1-Análise do padrão de esterases.....	21
2-Análise do uso dos inibidores.....	21
3-Análise do padrão de esterases.....	21
4-Análise do padrão dos híbridos.....	21
5-Análise de aglomerados.....	21
IV-DISCUSSÃO.....	67
V-RESUMO E CONCLUSÕES.....	67
VI-SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	78
VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

“Vida devotada à atividade criadora em ciência é vida feliz. Nenhum outro modo de vida é igual ou superior em felicidade...Eu creio que o trabalho científico, juntamente com outras formas de trabalho criador, é o papel propulsor da evolução do espírito humano. A evolução do espírito humano dá significado à evolução humana e à evolução universal”.

T. Dobzhansky



ÍNDICE

I-INTRODUÇÃO.....	1
II-MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
1-Linhagens e manutenção no laboratório.....	14
2-Estudo dos padrões de esterases.....	14
2.1-Técnica de eletroforese e preparo dos géis.....	16
3-Características das amostras analisadas.....	17
3.1-Amostras dos adultos.....	18
3.2-Amostras para estudo dos padrões no desenvolvimento.....	18
3.3-Casulos vazios de pupas.....	18
3.4-Amostras dos híbridos.....	18
4-Preparo das amostras.....	19
5-Tratamento dos géis para identificação das esterases.....	19
6-Uso de inibidores.....	20
7-Secagem dos géis.....	21
8-Avaliação do grau de atividade das bandas esterásicas nos géis.....	21
9-Análise estatística.....	21
III-RESULTADOS.....	22
1-Análise do padrão de esterases dos adultos.....	22
2-Análise do uso dos inibidores: malathion, sulfato de eserina e pCMB.....	42
3-Análise do padrão de esterases no desenvolvimento.....	42
4-Análise do padrão dos híbridos interespecíficos.....	53
5-Análise de aglomerados.....	64
IV-DISCUSSÃO.....	67
V-RESUMO E CONCLUSÕES.....	76
VI-SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	78
VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80



I-INTRODUÇÃO

A estrutura genética das populações e espécies pode ser melhor entendida considerando dados de diferentes tipos de marcadores. Em *Drosophila*, dentre os marcadores mais utilizados, encontram-se as esterases, as quais constituem um dos grupos enzimáticos mais polimórficos do gênero (Johnson, 1973, 1974), consequentemente apresentando grande interesse do ponto de vista evolutivo. Entre os vários estudos realizados nesse organismo incluem-se os desenvolvidos em *D. pseudoobscura* (Hubby & Lewontin, 1966; Lewontin & Hubby, 1966; Brady & Richmond, 1992; Veuille & King, 1995), *D. simulans* (Karotan *et al.*, 1995), *D. melanogaster* (Berger, 1971; Band, 1975; Laurie-Ahlberg *et al.*, 1982; Healy *et al.*, 1991; Spicer & Fleming, 1991; Pralavorio & Fournier, 1992; Parkash *et al.*, 1993; Robin *et al.*, 1996), *D. obscura* (Lakovaara & Saura, 1971), *D. ananassae* (Johnson, 1971), *D. willistoni* (Mourão, 1969; Ayala *et al.*, 1970, 1972), *D. mercatorum pararepleta* (Rodrigues Pereira, 1979), *D. mettleri* (Yum *et al.*, 1991), *D. buzzatii* (East, 1982; Barker, 1994), *D. mulleri* (Johnson *et al.*, 1968; Kambysells *et al.*, 1968, Ceron, 1988), *D. arizonae* (Zouros *et al.*, 1982; Ceron, 1988), *D. mojaviensis* (Zouros *et al.*, 1982; Zouros & van Delden, 1982; Pen *et al.*, 1986b), *D. busckii* (Parkash *et al.*, 1992), *D. hydei* (Sullivan *et al.*, 1994), *D. maculifrons* (Romero-Saavedra *et al.*, 1995) e espécies do cluster *buzzatii* (Lapenta *et al.*, 1995, 1998).

A técnica mais comum para estudar as variações enzimáticas é a eletroforese em gel. Esta técnica tem sido utilizada pelos geneticistas em seus estudos desde 1947 (Aldridge, 1953). Atualmente, são utilizados vários tipos de géis, como os preparados com acetato de celulose, agarose, amido e poliacrilamida.

As esterases são classificadas como hidrolases, um grupo amplo e diverso de enzimas que participam da hidrólise de ésteres, peptídeos, amidas e haletos. O fato das enzimas mostrarem atividade esterásica podendo hidrolisar ligações não-éster, origina problemas para a terminologia e a classificação das mesmas. Mas, está claro que algumas esterases são de ampla especificidade ao substrato e são capazes de hidrolisar ésteres endógenos e exógenos, de estruturas muito diferentes. Muitos pesticidas,

drogas e outros produtos químicos sintéticos são ésteres. Os grupos organofosforados, carbamatos e piretróides são inseticidas que se encontram nesta categoria (Walker & Mackness, 1983).

A atividade das esterases é geralmente demonstrada utilizando-se métodos histoquímicos de coloração com substratos sintéticos que não apresentam relação com os substratos biológicos como, por exemplo, os ésteres do naftol (Shaw, 1965) e da 4-metilumbeliferona (Hopkinson *et al.*, 1973). Por essa razão, as esterases foram denominadas enzimas inespecíficas (Shaw, 1965).

Augustinsson (1959, 1961 apud Walker & Mackness, 1983) classificou as esterases baseado na hidrólise de substratos simples como fenilacetato, triacetina e butiricolina. Esta classificação distingue as aliesterases (que hidrolisam substratos alifáticos), as arilesterases (que hidrolisam substratos aromáticos) e as colinesterases (que hidrolisam ésteres de colina). Logo verificou-se que não havia uma distinção clara entre aliesterase e arilesterase. Preparações de aliesterases hidrolisam arilésteres e arilesterases hidrolisam aliésteres.

Aldridge (1953), baseado no efeito dos organofosfatos sobre as esterases, classificou-as em A e B. As esterases A hidrolisam organofosfatos e as esterases B são inibidas pelos organofosfatos. Ambas diferem pelo fato de que nas esterases B, um resíduo de serina no sítio ativo é fosforilado, enquanto isto não parece ocorrer com as esterases A. De acordo com Walker & Mackness, a classificação de Aldridge tem algum valor prático na toxicologia. As colinesterases, um tipo de esterase B constituem um alvo de ação dos pesticidas organofosforados e carbamatos. A carboxilesterase, outro tipo de esterase B, foi encontrada em altos níveis em certas linhagens resistentes de afídios (Devonshire, 1977 apud Walker & Mackness, 1983). Posteriormente, foram descritas as esterases C que não interagem com organofosfatos (Bergmann, *et al.*, 1957, apud Walker & Mackness, 1983).

De acordo com Walker & Mackness (1983), ambos os métodos de classificação das esterases descritos estão longe de serem reais. Os termos aliesterases e arilesterases não levam em conta a ampla especificidade aos substratos e a sobreposição de muitas esterases, enquanto o método de Aldridge não leva em conta a



especificidade ao substrato além daquela que se refere aos organofosfatos e carbamatos.

Com base no efeito da presença de inibidores (reagentes sulfidrílicos, como o pCMB -ácido p-cloromercuribenzoato; organofosfatos, como paraoxon, fenitrooxon (Ops) e diisopropil fluorofosfato (DFP) e sulfato de eserina) as esterases foram divididas em quatro classes: carboxilesterases, arilesterases, colinesterases e acetilesterases (Heymann, 1980, apud Healy *et al.*, 1991; Oakeshott, 1993).

As carboxilesterases são inibidas apenas por organofosfatos. Estas enzimas catalisam a hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos em ácido e álcool livres, hidrolisando preferencialmente ésteres alifáticos de cadeias longas. Agem também sobre amidas aromáticas, ésteres aromáticos e tioésteres. As carboxilesterases mais conhecidas são as que ocorrem no fígado de mamíferos (Huang *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1994).

As arilestrases (EC 3.1.1.2) são inibidas por reagentes sulfidrílicos, como mercúrio e chumbo, e por cátions metálicos e atuam, preferencialmente, sobre substratos aromáticos. Nos mamíferos, estas enzimas localizam-se, principalmente, no plasma, mas seu papel fisiológico é desconhecido.

As colinesterases são inibidas por organofosfatos e sulfato de eserina, sendo esta última substância responsável pela distinção entre carboxilesterases e colinesterases. As colinesterases podem ainda ser classificadas em acetilcolinesterases (EC 3.1.1.7) e pseudocolinesterases (EC 3.1.1.8).

As acetilcolinesterases (EC 3.1.1.7) participam da transmissão do impulso nervoso, catalisando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. São enzimas-chave no sistema nervoso dos insetos (Pralavorio & Fournier, 1992). Nesses organismos, inibidores da acetilcolinesterase têm sido utilizados como inseticidas, uma vez que esta enzima apresenta função importante no sistema colinérgico dos mesmos. Os organofosforados e os carbamatos são os inibidores de uso comum; ligam-se covalentemente ao sítio ativo da enzima e causam a morte do inseto. Os inseticidas organofosforados ligam-se ao sítio catalítico da acetilcolinesterase, impedindo a

hidrólise da acetilcolina. Esse neurotransmissor acumula-se na sinapse nervosa impedindo a condução do impulso nervoso e o inseto morre por espasmos musculares.

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

As acetilesterases (EC 3.1.16) não são inibidas por nenhum dos agentes acima citados e atuam sobre substratos alifáticos derivados do ácido acético.

As esterases têm sido bastante estudadas em vertebrados e invertebrados. Entre os invertebrados, além da *Drosophila*, já mencionada, incluem-se, o térmita *Odontotermes horni*. w. (Seerama & Veerabhadrapa, 1991); o besouro *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu & Clark, 1993); o hemiptera *Lygus hesperus* (Zhu & Brindley, 1992); a mosca-do-chifre *Haematobia irritans* (Elvin *et al.*, 1993; Castiglione-Ruiz *et al.*, 1997); o mosquito *Aedes* (Lima-Catelani, A. R. A., 1996) e a mariposa *Galleria mellonella* (Jindra *et al.*, 1994). Entre os vertebrados, o rato (Robbi & Beaufay, 1994; Morgan *et al.*, 1994; Alexson *et al.*, 1994); o boi (Chakraborti *et al.*, 1993; Hattori *et al.*, 1994) e o camundongo (Kelly *et al.*, 1994). Em vegetais, mencionamos o arroz *Oryza sativa* (Cho *et al.*, 1994), em fungo *Monascus* (Nishikawa & Iizuka, 1993) e, em procariontes, a bactéria *Pseudomonas sp* (Shimada *et al.*, 1993).

Embora estas enzimas tenham sido estudadas em uma diversidade de organismos, as maiores evidências do seu funcionamento foram obtidas nos insetos. Há evidências de que elas participam dos processos digestivos (Kapin & Ahmad, 1980; Sreerama & Veerabhadrapa, 1991; Kerlin & Hugues, 1992; Argentine & James, 1995), de processos reprodutivos (Richmond & Senior, 1991; Costa *et al.*, 1983; Scott, 1986; Karotam *et al.*, 1993), da regulação dos níveis do hormônio juvenil (Kort & Granger, 1981; Zera & Holtmeier, 1992; Gu & Zera, 1994) e da degradação de inseticidas (Mutero *et al.*, 1994; Whyard *et al.*, 1994; Feyereisen, 1995).

Em *Aedes aegypti*, Argentine & James (1995) detectaram a presença de algumas esterases na glândula salivar, sendo secretadas na saliva, sugerindo a atuação



destas enzimas no processo de alimentação. Jones & Brancoft (1986) observaram que na espécie de caruncho *Anthonomus grandis*, havia uma grande quantidade da esterase-4 no intestino médio, em qualquer fase do desenvolvimento desse organismo. Neste caso, também, os autores interpretaram os dados como indicativos da participação destas enzimas nos processos digestivos. McGher (1992, apud Kennedy *et al.*, 1993) também caracterizou uma carboxilesterase não específica que se expressa somente no intestino de uma espécie de nemátodo, o *Caenorhabditis elegans*, e que foi considerada relacionada a funções digestivas.

Ainda em relação à função das esterases no processo digestivo, citamos o trabalho de Kerlin & Hugues (1992) que analisaram as secreções salivares das espécies *Aedes aegypti*, *Boophilus microplus*, *Lucilia cuprina* e *Haematobia irritans*. Os autores verificaram diferenças enzimáticas (entre as quais incluem-se as esterases) da saliva e tecidos do intestino destas espécies, mostrando que estes insetos apresentam estratégias alimentares diferentes.

Outro aspecto importante no estudo da fisiologia das esterases é sua atuação no processo reprodutivo. A esterase-6 de *Drosophila melanogaster*, por exemplo, tem sido muito estudada quanto ao seu papel relacionado à reprodução dos machos. Esta enzima é uma carboxilesterase que tem afinidade pelo β -naftil acetato, é produzida no ducto ejaculatório anterior do aparelho reprodutivo dos machos adultos. Nesta espécie, ela desempenha uma função importante, sendo transferida para o sistema reprodutivo das fêmeas durante a cópula (Richmond & Senior, 1981; Gilbert *et al.*, 1981), afetando o subsequente comportamento reprodutivo da fêmea (Scott, 1986). Mane *et al.* (1983) verificaram que a esterase-6 é transferida para o sistema reprodutor das fêmeas juntamente com o cis-vacênil acetato, um lipídeo produzido também pelos machos. A esterase hidrolisa este lipídeo e o produto da reação passa a agir como um antiafrodisíaco. A reação é finalizada seis horas após a cópula; neste período, as fêmeas tornam-se menos receptivas quando comparadas com fêmeas virgens ou com fêmeas após dez minutos da inseminação.

Quanto ao processo de degradação dos inseticidas, a utilização de pesticidas contra os insetos fornece um modelo de estudo da adaptação de organismos eucariotos

sob forte pressão seletiva. Pralavorio & Fournier (1992) isolaram 13 linhagens de *Drosophila melanogaster* resistentes ao parathion (inibidor da acetilcolinesterase) e observaram a existência de quatro tipos de proteínas envolvidas no processo de resistência, sugerindo que várias mutações da acetilcolinesterase são responsáveis pelo mesmo, nesse organismo. Mutero *et al.* (1994) analisaram a sequência do gene da AchE em várias linhagens resistentes de *Drosophila melanogaster*, resultando na identificação de cinco mutações em ponto associadas com baixa sensibilidade a inseticidas. Em alguns casos, várias dessas mutações foram encontradas combinadas na mesma proteína, levando a padrões de resistência diferentes.

Campbell *et al.* (1997) estudaram as atividades esterásicas associadas com resistência a inseticidas comparando as atividades das aliesterases (hidrolisam metil butirato) de *Lucilia cuprina*, *Musca domestica* e *Drosophila melanogaster*. Os resultados sugeriram que as aliesterases das três espécies são ortólogas.

As esterases também participam da degradação do hormônio juvenil, sendo esta uma função fundamental no desenvolvimento dos insetos. O hormônio juvenil (JH) é degradado por uma carboxilesterase, que desempenha, assim, um papel regulatório importante na metamorfose nesses organismos (Roe *et al.*, 1993; Zera & Holtmeier, 1992). Rauschenbach *et al.* (1987) verificaram que a esterase-P de *D. virilis* é a enzima responsável pela inativação do hormônio juvenil, sendo essa inativação necessária para que a metamorfose seja completada.

Ainda com referência à função das esterases, em adultos de *D. buzzatii* (grupo *repleta*), East (1982) verificou a presença de duas esterases principais que foram designadas de esterase 1 (α -esterase) e esterase 2 (β -esterase). A análise das mesmas, durante o desenvolvimento, revelou uma terceira banda de atividade, exclusiva das larvas de 3º estágio tardio, também específica para o β -naftil acetato, que foi denominada esterase J (juvenil) e que ocorre, predominantemente, na carcaça. Esse autor propôs que a esterase 2 da fase adulta poderia estar envolvida com os processos de digestão e absorção de ésteres, ou nos processos de desintoxicação. As esterases 1 e J agiriam em conjunto na fase larval, modulando apenas a concentração do hormônio

juvenil. Na fase adulta apenas a esterase 1 seria responsável pelo controle deste hormônio.

A esterase-6 (EST-6) de *D. melanogaster*, à qual já nos referimos anteriormente, é uma das esterases mais estudadas. Esta enzima apresenta duas variantes eletroforéticas principais, atribuídas à presença de dois alelos codominantes. Ambos são frequentemente encontrados em populações naturais. Procunier *et al.* (1991) estabeleceram a localização deste loco a 36,8 unidades de recombinação, no cromossomo 3, e mais precisamente, pela técnica de hibridação *in situ*, na seção 69 A1-A3. Essa esterase é produzida em vários estágios da vida e diversos tecidos de *Drosophila*, mas sua expressão é maior no ducto ejaculatório dos machos adultos, como já foi mencionado. Outros estudos, envolvendo esta esterase, analisaram os níveis de atividade em diferentes espécies (Karotan & Oakeshott, 1993) e a sequência de bases do gene em *D. simulans* e *D. melanogaster* (Karotam *et al.*, 1995), entre outros.

A esterase-A também foi bastante estudada em *D. melanogaster*. As variações eletroforéticas deste loco foram inicialmente atribuídas a fatores não genéticos (Beckman & Johnson, 1964). Posteriormente, foi demonstrada a presença de um alelo nulo com herança recessiva (Mizianty & Case, 1971; Oliveira & Cordeiro, 1982).

Em outro estudo, *Drosophila melanogaster* foi transformada com o gene da esterase S de *Drosophila virilis*, incluindo a região reguladora formada por 400 pares de base. Este gene expressa-se fortemente no bulbo ejaculatório dos machos de *D. virilis* e no ducto ejaculatório dos machos de *D. melanogaster*. As expressões tecido-específica e estágio específica da cópia genômica incompleta do gene da esterase S, integrada no genoma de *D. melanogaster* são as mesmas apresentadas por *D. virilis*. Korochkin *et al.* (1995) e Sergeev *et al.* (1995) utilizaram estes dados para mostrar que a especificidade é determinada pela região reguladora 5' do gene da esterase S, atuando em cis. A comparação entre as sequências de aminoácidos da esterase S de *D. virilis* e da esterase 6 de *D. melanogaster* revelou 50% de homologia.

Os numerosos estudos realizados com esterases têm demonstrado que os locos que as determinam são bastante polimórficos. Em *D. virilis*, dois locos estruturais Est-

α e Est- β , correspondendo, respectivamente, às alfa e beta esterases, descritos por Narise (1973), mostraram-se altamente polimórficos, em trabalhos que se seguiram. Tsuno *et al.* (1984) detectaram a presença de 16 variantes para o loco Est- α e 11 para o loco Est- β . Tsuno (1988) refere-se a alelos deste loco que podem produzir mutantes diferentes dos tipos alélicos parentais por uma suposta recombinação intragênica nas fêmeas heterozigotas; isso não ocorre nem em homozigotas e nem em machos heterozigotos.

Barker (1994) caracterizou a variação alélica para a esterase-2 em duas populações de *D. buzzatti* da Austrália que são separadas por 550 Km. Um total de 25 alelos foram detectados, dos quais nove foram exclusivos de uma população, oito exclusivos da outra e oito foram comuns às duas populações. Nesse trabalho o autor associou frequências alélicas e arranjos cromossômicos. As frequências alélicas dentro de cada população foram significativamente diferentes entre duas sequências de cromossomos consideradas (padrão e inversão J) e a frequência alélica em cada arranjo foi significativamente diferente entre as duas populações.

O polimorfismo das esterases também foi verificado em outros insetos, além da *Drosophila*. Krafur & Black (1992) descreveram o polimorfismo enzimático de 50 locos em *Musca autumnalis*; os estudos revelaram que 62% dos 50 locos eram polimórficos. Lai-Fook & Smith (1992) analisaram o padrão de esterases da hemolinfa dos adultos de *Lucilia cuprina*, identificando 10 bandas esterásicas, produzidas por dois locos genéticos.

No que se refere às esterases, alguns estudos mostram a ocorrência de polimorfismo por duplicação e diferenciação gênicas. Por exemplo, em *Drosophila mojavensis*, Zouros & van Delden (1982) detectaram duas beta esterases, EST-4 e EST-5. Estas esterases são tidas como produtos de um gene duplicado e se expressam em diferentes fases do desenvolvimento. A EST-4 é específica de larvas de 3º estágio tardio e é encontrada na carcaça; a EST-5 é constante no desenvolvimento, e é detectada na hemolinfa e no corpo gorduroso. Pen *et al* (1986) produziram anticorpos para essas esterases, tendo verificado que elas exibem pequenas diferenças na

composição de aminoácidos e suas sequências N-terminal são bastante idênticas, indicando, claramente, sua origem comum.

A análise das esterases têm-se mostrado, também, importante para estudos de proximidade filogenética entre populações e espécies. Em linhagens de *Drosophila* do complexo *buzzatii*, Lapenta *et al.* (1995; 1998) analisaram padrões de esterases que permitiram estabelecer as relações de proximidade entre elas, utilizando Índice de Similaridade e Análise de Dependência. Os resultados destes estudos foram importantes para o reconhecimento do *status* de novas espécies, em populações anteriormente consideradas de uma mesma espécie.

Em *Drosophila pseudoobscura*, a EST-5 é codificada por um dos três genes parálogos, Est-5A, Est-5B e Est-5C. O loco homólogo da Est-6 em *Drosophila melanogaster* tem apenas um vizinho parálogo, Est-P. Brady & Richmond (1992) compararam as sequências de DNA codificadoras e flangeadoras, entre os três genes de *D. pseudoobscura* e os dois de *D. melanogaster*. Os resultados indicaram que dois genes parálogos estavam presentes antes da divergência de *D. pseudoobscura* e *D. melanogaster* e que, pelo menos, uma duplicação ocorreu em *D. pseudoobscura*.

Assim, a importância dos resultados obtidos em várias espécies de *Drosophila* recomendam que as esterases sejam analisadas em outros grupos de espécies. No presente trabalho utilizamos a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para analisar o padrão de esterases em espécies de *Drosophila* do subgrupo *saltans*, do grupo de mesmo nome.

O subgrupo *saltans* compõe-se de sete espécies: *D. prosaltans* Duda, 1927, *D. lusaltans* Magalhães, 1962, *D. saltans* Sturtevant, 1916, *D. nigrosaltans* Magalhães, 1962, *D. septentriosaltans* Magalhães & Buck, 1962, *D. austrosaltans* Spassky, 1957 e *D. pseudosaltans* Magalhães, 1956. Este grupo constitui um exemplo de especiação acompanhada por pequena diferenciação morfológica dando origem às espécies denominadas crípticas.

Apesar da grande semelhança morfológica externa, suas identidades específicas são perfeitamente bem estabelecidas. Em geral, a identificação das espécies crípticas é

baseada em testes de cruzamentos, na análise cromossômica e no estudo da morfologia da genitália masculina (Magalhães, 1962).

O grupo *saltans* foi estabelecido por Sturtevant (1942) como membro do subgênero *Sophophora*. O grupo constitui-se de 21 espécies e sua distribuição ocorre do México ao Rio Grande do Sul e Paraguai.

Uma revisão do grupo *saltans* de *Drosophila* quanto à taxonomia, morfologia e distribuição foi apresentada por Magalhães (1962). Esse mesmo autor caracterizou as espécies do grupo pela morfologia do 6º e 7º externitos e espermatecas das fêmeas, e dos edeagos dos machos.

As espécies do grupo *saltans* foram analisadas quanto ao acúmulo do pigmento pteridina por Throckmorton e Magalhães (1962). Com base nesses resultados, esses autores estabeleceram uma primeira filogenia do grupo, na qual o subgrupo *saltans*, objeto do presente trabalho, pareceu representar o ápice de uma população tronco do grupo. De acordo com os autores, eventos evolutivos mais recentes foram os que envolveram a subdivisão, dessa população tronco, no aglomerado de espécies crípticas que compõem o subgrupo *saltans*. Ainda, de acordo com mesmos autores, a maioria dessas espécies apresenta uma distribuição restrita, sugerindo sua derivação como isolados regionais a partir da população tronco mais expandida.

Drosophila prosaltans mostrou a maior variabilidade quanto ao acúmulo de pteridinas no corpo e também a mais alta concentração de drosopterina D, podendo ser considerada a própria população tronco. Entretanto, apesar disso, os autores reconhecem que uma ou duas características analisadas não constituem um indicativo adequado da diversidade total.

O conhecimento das espécies do subgrupo *saltans* foi ampliado com o estudo de isolamento reprodutivo (Bicudo, 1973 a) e da variabilidade cromossômica devida a inversões (Bicudo, 1973 b). O resultado do primeiro desses estudos permitiu verificar que o intercruzamento das espécies do subgrupo só produz cruzamentos férteis quando realizado entre *D. prosaltans* e *D. saltans*, *D. prosaltans* e *D. septentriosaltans*, *D. prosaltans* e *D. lusaltans*, *D. saltans* e *D. lusaltans* e *D. lusaltans* e *D. septentriosaltans*. Nestes casos, os híbridos machos são estéreis em uma ou nas duas

direções de cruzamento. A partir de medidas do isolamento, nesse trabalho, foi estabelecida uma relação de proximidade entre as espécies do subgrupo, na qual *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. lusaltans* constituíam um primeiro grupo de proximidade maior, *D. austrosaltans* e *D. nigrosaltans*, um segundo grupo, *D. septentriosaltans* por sua vez estaria mais próxima do primeiro grupo do que do segundo. Quanto à *D. pseudosaltans*, seria mais distante de todas as demais.

Outro trabalho sobre isolamento reprodutivo abrangeu 18 linhagens de *D. prosaltans* procedentes desde a América Central até o sul do Brasil (Bicudo, 1978). Esse trabalho mostrou que devido ao isolamento incipiente, essas linhagens poderiam ser diferenciadas no que foi denominado de três conjuntos de isolamento : A, B, C. O conjunto de isolamento A incluía as linhagens da América Central, o conjunto B incluía as linhagens da América do Sul, ao norte do Rio Amazonas e o conjunto C incluía as linhagens brasileiras, ao sul do Rio Amazonas. Os mecanismos de isolamento encontrados operando entre os três conjuntos foram isolamento sexual e esterilidade dos híbridos atuando principalmente entre A e B e entre A e C. Os resultados foram comparáveis aos das semiespécies de *D. paulistorum*. Assim, a autora concluiu que os três conjuntos poderiam ser classificados da mesma forma.

No que se refere ao polimorfismo cromossômico, as mesmas espécies mostraram 23 inversões, sendo *D. prosaltans* a que apresentou maior variabilidade, seguida de *D. saltans*. As demais espécies, com uma distribuição geográfica mais restrita, apresentaram polimorfismo reduzido ou mesmo ausente. As variabilidades intraespecífica e interespecífica permitiram traçar a relação filogenética das sete espécies com base na inversão PS3 do braço IIL, de forma que, em um extremo, teríamos *D. prosaltans*, no outro cinco espécies partilhando as mesmas inversões básicas (*D. austrosaltans*, *D. lusaltans*, *D. nigrosaltans*, *D. saltans* e *D. septentriosaltans*) e, entre os dois extremos, a espécie *D. pseudosaltans*. Essa disposição filogenética não indica a direção de evolução dentro do subgrupo. Considerando as inversões dos cromossomos II e III, a sequência permaneceu a mesma e o que se obteve foi apenas o desmembramento das cinco espécies do extremo acima referido.



Recentemente, as espécies do grupo *saltans* foram submetidas a um estudo das sequências de DNA mitocondrial e nuclear (O'Grady *et al.*, 1998). Foram utilizadas sequências nucleotídicas de dois locos nucleares (Adh-álcool desidrogenase e ITS1-espçador 1 interno transcrito do DNAr nuclear) e dois genes mitocondriais (COI-citocromo oxidase I e COII-citocromo oxidase II). A análise combinada dos dados permitiu construir uma filogenia na qual os subgrupos *saltans* e *parasaltans* ocupam a posição derivada mais recentemente. Os autores concluíram que, da mesma forma que os estudos morfológicos anteriores, as relações filogenéticas dentro do subgrupo *saltans* não foram satisfatoriamente resolvidas pelos dados moleculares. Por exemplo, os dados de ITS 1 (espçador interno transcrito 1 do DNAr nuclear) e o COI (citocromo oxidase I) colocam *D. austrosaltans* dentro do subgrupo *saltans* como esperado, enquanto COII coloca essa espécie como um táxon irmão, separado das demais espécies do subgrupo. Por outro lado, os autores consideraram que os resultados obtidos por essa análise molecular foram incongruentes quando comparados tanto com os dados obtidos pelo isolamento reprodutivo (Bicudo, 1973 a), quanto com o dados de inversão cromossômica (Bicudo, 1973 b).

No presente trabalho foram estudadas quatro espécies do subgrupo *saltans*, incluindo linhagens mantidas longamente em laboratório e linhagens mais recentemente coletadas, objetivando:

- 1-Characterizá-las e compará-las quanto ao padrão de esterases;
- 2-Verificar a existência de variações no padrão de esterases entre os sexos, em cada linhagem;
- 3-Estudar as possíveis variações dos padrões de esterases no desenvolvimento;
- 4-Tentar obter uma classificação bioquímica inicial, das bandas esterásicas, utilizando inibidores de efeitos conhecidos;
- 5-Analisar o padrão de esterases de híbridos interespecíficos para verificar se ocorrem alterações no padrão de bandas que possam ser atribuídas ao efeito de mecanismos de regulação gênica;

II-M/ 6-Com base nas bandas esterásicas partilhadas ou exclusivas, tentar estabelecer a proximidade filogenética entre as espécies por um parâmetro pelo qual não foram avaliadas anteriormente;

7-Comparar a relação de proximidade filogenética obtida pelo uso dos padrões de esterases, com os resultados obtidos por outros parâmetros.

Entre as 16 linhagens analisadas, 10 vêm sendo mantidas em laboratório há um número variável de anos, algumas desde a década de 60, as seis demais foram coletadas mais recentemente e analisadas de 6 meses a 2 anos após a coleta. As linhagens recém-coletadas foram cedidas pelo Dr. Carlos Ribeiro Vilela, da USP de São Paulo, pela Dra. Vera Lúcia Valente Gaiensky, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS e pelo grupo do Dr. Fábio de Melo Sene, da USP de Ribeirão Preto-SP. Para controle externo foi incluída a linhagem Canton S, da espécie de *D. melanogaster*, cedida pela Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, deste Instituto que a recebeu da Dra. Margareth G. Kidwell, Universidade do Arizona, AZ, USA.

As linhagens são mantidas no laboratório do Departamento de Biologia do IBILCE, à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ em meio de subá-agar.

2. Estudo dos padrões de esterases

Os padrões de esterases foram analisados, utilizando-se a técnica de eletroforese em géis de poliácridamida. O gel de poliácridamida consiste na formação de uma "malha" tridimensional entre o monômero acrilamida e seu co-monômero de ligação cruzada, a N, N'-metilbisacrilamida (BIS), por uma reação de polimerização, auxiliada por catalisadores. Geralmente, são utilizados como catalisadores o persulfato de amônio e o TEMED (N, N, N', N' tetrametilenodiamina).



II-MATERIAIS E MÉTODOS

1. Linhagens e manutenção no laboratório

Tabela 1. Código, procedência e número de indivíduos analisados das linhagens de

A **Tabela 1** contém a lista de linhagens e espécies analisadas do subgrupo *saltans*, do grupo de mesmo nome, subgênero *Sophophora*.

Entre as 16 linhagens analisadas, 10 vêm sendo mantidas em laboratório há um número variável de anos, algumas desde a década de 60, as seis demais foram coletadas mais recentemente e analisadas de 6 meses a 2 anos após a coleta. As linhagens recém-coletadas foram cedidas pelo Dr. Carlos Ribeiro Vilela, da USP de São Paulo, pela Dra. Vera Lúcia Valente Gaiensky, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS e pelo grupo do Dr. Fábio de Melo Sene, da USP de Ribeirão Preto-SP. Para controle externo foi incluída a linhagem Canton S, da espécie de *D. melanogaster*, cedida pela Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, deste Instituto que a recebeu da Dra. Margareth G. Kidwell, Universidade do Arizona, AZ, USA.

As linhagens são mantidas no laboratório do Departamento de Biologia do IBILCE, à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ em meio de fubá-agar.

D. saltans H 112.2 (P₁) Sangre Grande, Trinidad 106 108

H 130.40 (S₁) San José, Costa Rica 128 166

H 1911.5 (S₂) San Salvador, El Salvador 123 116

H 1911.5 (S₃) Guatemala, Guatemala 74 78

Os padrões de esterases foram analisados, utilizando-se a técnica de eletroforese em géis de poliacrilamida. O gel de poliacrilamida consiste na formação de uma “malha” tridimensional entre o monômero acrilamida e seu co-monômero de ligação cruzada, a N, N’metilbisacrilamida (BIS), por uma reação de polimerização, auxiliada por catalisadores. Geralmente, são utilizados como catalisadores o persulfato de amônio e o TEMED (N, N, N’, N’ tetrametilenodiamina).

2.1. Técnica de eletroforese e preparação dos géis

(Na análise das esterases utilizamos o sistema descontínuo de pH e tampões

Tabela 1. Código, procedência e número de indivíduos analisados das linhagens de *D. prosaltans*, *D. austrosaltans*, *D. saltans* e *D. septentriosaltans*. F=fêmea; M=macho.

Espécies	Linhagens	Procedência	Nº de indiv. analisados	
			F	M
<i>D. prosaltans</i>	(P _{Est}) *	Margem do Rio Grande, SP	34	50
	(P ₁₆₀) *	Santana do Riacho, MG, Brasil	80	82
	(P _{BG}) *	Barra Grande, RS, Brasil	90	88
	(P _{MS}) *	Morro Santana, RS, Brasil	118	90
	(P _E) *	Eldorado, RS, Brasil	72	68
	H 4021 (P _{2a})	Piedras Blancas, Costa Rica	116	114
	H 112.2 (P ₄)	Sangre Grande, Trinidad	106	108
	H 191.68 (P ₅)	Bucaramanga, Colômbia	154	156
<i>D. austrosaltans</i>	H 2536.4 (A)	Pirassununga, SP	100	134
<i>D. saltans</i>	H 180.40 (S ₁)	San José, Costa Rica	128	166
	H 29.6 (S _{2a})	San Salvador, El Salvador	122	116
	H 1911.5 (S ₃)	Guatemala, Guatemala	74	78
	H 1911.7 (S ₇)	Chilpancingo, México	108	98
	(S _M) *	México, México	38	44
	(Ch)	Chilpancingo, México	96	98
<i>D. septentriosaltans</i>	H 10321 (Se)	Sevilla, Colômbia	176	200

*Linhagens recém-coletadas

(Os componentes g e f atuam como catalisadores da reação de polimerização.

(Os volumes de água e demais componentes utilizados para o preparo dos géis a 12% de concentração são os seguintes, para um volume final de 50ml:

8,70 ml de água

2.1. Técnica de eletroforese e preparação dos géis

(Na análise das esterases utilizamos o sistema descontínuo de pH e tampões (Davis, 1964) constituído de um gel de separação a 12% de concentração preparado em tampão Tris-HCl 0,37 M pH 8,8) e de um gel de empilhamento a 4% de concentração preparado em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8.

(Para o preparo dos géis de separação) e de empilhamento foram utilizadas as seguintes soluções estoques e tampões adaptados dos trabalhos de Davis (1964) e Laemmli (1970):

- Solução A: (acrilamida/bisacrilamida) para o gel de separação, preparada com 30 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida dissolvidas em água destilada para um volume final de 100 ml. Essa solução foi filtrada em papel de filtro e mantida em frasco escuro na geladeira.
- Solução A': (acrilamida/bisacrilamida modificada) para o gel de empilhamento, preparada com 15 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida dissolvidas em água destilada para um volume final de 50 ml, também filtrada e mantida em frasco escuro na geladeira.
- Tampão do gel de separação (4x concentrado): Tris 1,5 M ajustado a pH 8,8 com HCl 6 M. Mantido em frasco escuro na geladeira.
- Tampão do gel de empilhamento (4x concentrado): Tris 0,5 M ajustado a pH 6,8 com HCl 6 M. Mantido em frasco escuro na geladeira.
- Solução de persulfato de amônio a 2%, recém preparada. (Essa solução foi mantida no freezer e descongelada na hora do uso.)
- TEMED (N, N, N', N', tetrametilenodiamina) com aproximadamente 99% de pureza; este deve ser o último componente a ser adicionado à solução, dando início a polimerização.

(Os componentes e e f atuam como catalisadores da reação de polimerização.

(Os volumes de água e demais componentes utilizados para o preparo dos géis a 12% de concentração são os seguintes, para um volume final de 50ml:

8,70 ml de água

6,15 ml de tampão do gel (pH 8,8)

9,75 ml de solução A (acrilamida/bis)

0,40 ml de persulfato de amônia

25 µl de TEMED)

(Adicionava-se essa solução entre duas placas de vidro de 15x17x0,5 cm) e sobre esta solução, uma pequena camada de água. Esperava-se uma hora para a polimerização e em seguida procedia-se à polimerização do gel de empilhamento.

Os volumes de água e demais componentes para o preparo dos géis a 4 % de concentração foram os seguintes para um volume final de 20 ml:

12 ml de água

5,0 ml de tampão do gel (pH 6,8)

2,70 ml da solução A' (acrilamida/bis)

0,30 ml de persulfato de amônia

20 µl de TEMED

Após a retirada da camada de água, aplicava-se a solução para o gel de empilhamento sobre o gel de separação e (adaptava-se o pente de acrílico com 20 dentes para a formação dos poços de aplicação das amostras. Após a polimerização do gel) de empilhamento, (o pente e o espaçador inferior eram retirados e as placas eram dispostas, na posição vertical, em uma cuba de acrílico com o auxílio de quatro garras. O modelo da cuba de eletroforese possibilitava a adaptação de dois conjuntos de placas ao mesmo tempo, permitindo a análise simultânea de 40 amostras.)

3. Características das amostras analisadas

Os padrões de esterases foram analisados (a) em adultos de todas as linhagens, (b) no desenvolvimento, (c) utilizando larvas e pupas e casulos de pupas vazios e (d) em híbridos interespecíficos.



3.1. Amostras dos adultos

Após o repique (transferência do estoque de moscas para meio novo), realizado a cada 25 dias, moscas virgens recém-nascidas eram coletadas, separadas quanto ao sexo e transferidas para meio de fubá-agar, onde permaneciam até completarem 10 dias de idade. Em seguida, eram analisadas ou congeladas a -20°C , para análise posterior. As moscas congeladas eram utilizadas no tempo máximo de um mês. Cada amostra foi preparada com dois indivíduos.

3.2 Amostras para estudo dos padrões no desenvolvimento

Larvas de 3º estágio tardio foram coletadas entre aquelas que já tinham abandonado o meio de cultura e se movimentavam pela parede das garrafas. As pupas foram coletadas no meio de cultura e paredes das garrafas. Após a coleta, as larvas de 3º estágio e as pupas eram lavadas em água destilada e em seguida congeladas a -20°C em tubos Eppendorf, para posterior análise eletroforética. Os géis para estudo de esterases no desenvolvimento continham amostras, preparadas com três larvas, duas pupas, duas fêmeas e dois machos.

3.3. Casulos vazios de pupas

Esses casulos eram obtidos no meio de cultura ou na parede das garrafas. Após a coleta, os casulos eram lavados, cuidadosamente, com água, para eliminar detritos aderidos ao mesmo e congelados a -20°C em tubos Eppendorf. Para comparação, as amostras dos casulos foram corridas junto com as larvas e pupas nos mesmos géis.

3.4. Amostras dos híbridos

Os híbridos foram obtidos por intercruzamentos das espécies *D. prosaltans* x *D. saltans* e *D. prosaltans* x *D. septentrionsaltans*, que, segundo Bicudo (1973 a), dão



cruzamentos férteis. Os cruzamentos foram realizados em garrafas, utilizando-se 10 a 20 casais com três dias de idade. Após sete dias do preparo do cruzamento, os pais eram congelados. Os híbridos eram retirados das garrafas à medida que nasciam e analisados com 10 dias de idade, juntamente com alguns dos pais.

4. Preparo das amostras e condições de eletroforese

(Os indivíduos foram macerados à temperatura ambiente, em 20⁵ µl do tampão de amostra (Tris 0,1 M pH 8,8, contendo glicerol a 10%), sendo utilizado um volume de 10 µl de cada amostra.)

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

5. Tratamento dos géis para identificação das esterases

(Foram utilizados como substratos para identificação das esterases nos géis, o α e β -naftil acetato. Após a eletroforese, os géis eram pré incubados em 50 ml de tampão fosfato, por 45 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o tampão era retirado e adicionava-se uma solução recém preparada e filtrada, constituída de 20 mg de α -naftil acetato, 15 mg de β -naftil acetato, previamente dissolvidos em 1 ml de acetona, 60 mg de Fast Blue RR Salt e 5 ml de n-propanol, dissolvidos em 50 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2 para a coloração e visualização das bandas esterásicas nos géis. A identificação das bandas com atividade esterásica nos géis, baseou-se nos métodos de coloração descritos por Johnson *et al.* (1966) e Steiner & Johnson (1973) modificados por Ceron (1988). Essa coloração permite diferenciar as bandas em α , β e α/β esterases, em função de sua afinidade pelo α , β ou ambos.)



7. Se (Após a coloração, os géis foram tratados com 100 ml de uma solução de descoloração contendo ácido acético, álcool etílico comercial e água na proporção de 1:2:7 por 24 horas.) Os géis foram então conservados em uma solução de ácido acético a 7,5% e glicerol 10% até o momento da secagem.

6. Uso de inibidores

(Com o objetivo de caracterizar bioquimicamente as bandas esterásicas, nos géis, foram utilizados inibidores considerados específicos para carboxilesterases e colinesterases.) *as quais estão envolvidas nos mecanismos de resist. do inset. (refer.)*

(Para a realização destes testes, foram utilizados três inibidores: malathion, sulfato de eserina e pCMB (para-cloromercuribenzoato).)

(Nestes testes foram utilizados dois indivíduos por amostra, macerados em 25 µl de tampão de amostra. Deste volume, foram tomadas porções de 10 µl aplicados em dois géis. Os dois géis, portanto, continham as mesmas amostras, uma das quais foi submetida a um dos inibidores e a outra foi o controle. Isto foi repetido para os três inibidores. A adição dos inibidores foi feita na pré-incubação ^{com tp. fosfato} e na solução de coloração após a eletroforese, permanecendo sempre um gel como controle (pré-incubado e corado, seguindo o procedimento normal). Os outros procedimentos para a realização da eletroforese foram os já descritos.

(Foram utilizados 10 µl de malathion 92% concentrado adicionado em 50 ml de tampão para a pré-incubação e em 50 ml da solução corante, o que equivalia a uma concentração de 0,7 mM.)

(A solução, contendo 0,1 mM de sulfato de eserina, foi preparada dissolvendo-se este composto diretamente no tampão utilizado para a pré-incubação do gel, após a eletroforese, e na solução corante. O mesmo processo ocorreu com o pCMB (para-cloromercuribenzoato), tendo sido utilizados 0,1 mM dessa substância, dissolvidos em 1 ml de NaOH 1 M.)

7. Secagem dos géis

1. An (A secagem dos géis foi baseada no método de Ceron *et al.* (1992). Os géis foram retirados da solução conservante e em seguida banhados em uma solução de gelatina comercial a 5%, prensados por um bastidor entre duas folhas de papel celofane e deixados à temperatura ambiente por três a quatro dias, para secagem. Com este procedimento os géis sofrem desidratação, transformando-se em uma fina película entre as folhas de celofane que então podem ser recortados e guardados para futuras análises.)

8. A avaliação do grau de atividade das bandas esterásicas nos géis

(Buscou-se uma quantificação do grau de atividade das bandas, em alguns casos, através do Programa **Global Lab Image**, em analisador de imagem, utilizando scanner para captura da imagem do gel e análise da mesma em gráficos de perfil. Dessa forma foi possível quantificar as diferenças de intensidade de coloração das bandas nos géis. Esse Programa reconhece 255 tons de cinza, do preto (0) ao branco (255). O eixo horizontal dos gráficos de perfil representa os pontos ao longo do segmento linear e o eixo vertical representa o valor em pixels, em cada ponto.)

9. Análise estatística

Foi realizada a Análise de Aglomerados (Cluster Analysis), que é uma técnica para agrupar indivíduos (ou variáveis) de acordo com uma medida de similaridade ou, complementarmente, de distância (Mardia *et al.*, 1980). Há vários métodos de análise de “cluster”, e no presente trabalho foi usado o de ligação simples (Single Linkage) e a medida de similaridade utilizada foi a Correlação de Pearson para os padrões de esterases.

III-RESULTADOS

1. Análise do padrão das esterases dos adultos

Foram analisadas, quanto ao padrão de esterases, 16 linhagens do subgrupo *saltans*, sendo 8 de *D. prosaltans*, 6 de *D. saltans*, 1 de *D. austrosaltans* e 1 de *D. septentriosaltans*, totalizando 3302 indivíduos (1612 fêmeas e 1690 machos). Como já foi mencionado, dessas 16 linhagens, 10 têm sido mantidas em laboratório há um tempo longo (algumas desde a década de 1960) e 6 foram analisadas de seis meses a 2 anos após a coleta. Como controle externo foi utilizada a linhagem Canton S (*D. melanogaster*).

No total, foram observadas, no subgrupo *saltans*, 34 bandas esterásicas, numeradas de acordo com a sua posição no gel, do cátodo para o ânodo, e classificadas, com base na sua afinidade pelos substratos α e β -naftil acetatos, em 18 α -esterases, 15 β -esterases e 1 α/β -esterase. A **Figura 1** mostra a distribuição esquemática dessas bandas nas linhagens analisadas e as **Figuras 2 a 4** mostram géis ilustrando parcialmente o padrão de bandas observado. As demais **Figuras** complementam esses padrões.

Três das 18 α -esterases foram detectadas exclusivamente em machos: bandas 11, 14 e 18 (**Tabela 2**). Essas bandas ocorreram nas espécies *D. saltans* e *D. septentriosaltans*. As bandas 11 e 18 ocorreram em ambas as espécies, com frequências variáveis entre as linhagens. Em *D. saltans* a banda 11 ocorreu em 100% dos machos das linhagens S₇ e S_M, 80% em Ch, 18% e 30% nas linhagens S_{2a} e S₃, respectivamente; a banda 18 ocorreu em 7,5% dos machos da linhagem S₁, 10% dos machos da linhagem Ch e 100% dos machos da linhagem S_M. Em *D. septentriosaltans*, a banda 11 ocorreu em 100% e a banda 18, em 1,2% dos machos analisados. A banda 14 ocorreu exclusivamente em *D. saltans*, com frequência também variável entre as linhagens (22% em S_{2a} e 100% em S₁) (**Figuras 5 e 6**).

A banda α -esterásica 33 ocorreu em todos os indivíduos analisados, de todas as

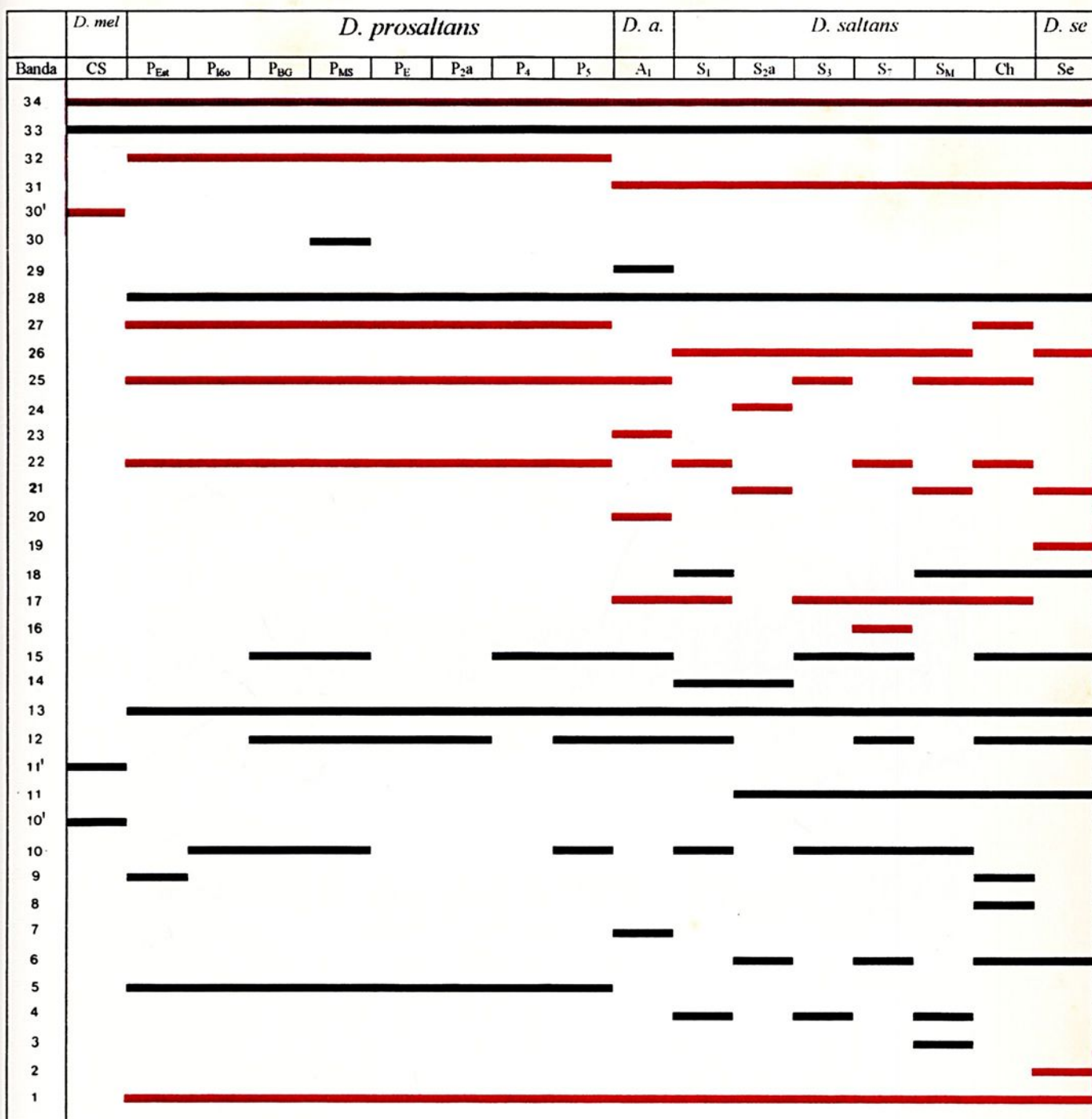


Figura 1. Distribuição das 34 bandas esterásicas nas linhagens analisadas. CS=*D. melanogaster* (controle externo), P_{Est}, P₁₆₀, P_{BG}, P_{MS}, P_E, P_{2a}, P₄, P₅ = *Drosophila prosaltans*; A = *D. austrosaltans*; S₁, S_{2a}, S₃, S₇, S_M e Ch = *D. saltans* e Se = *D. septentriosaltans*. Cor preta = α -esterase; cor vermelha = β -esterase; cor magenta = $\alpha\beta$ -esterase.

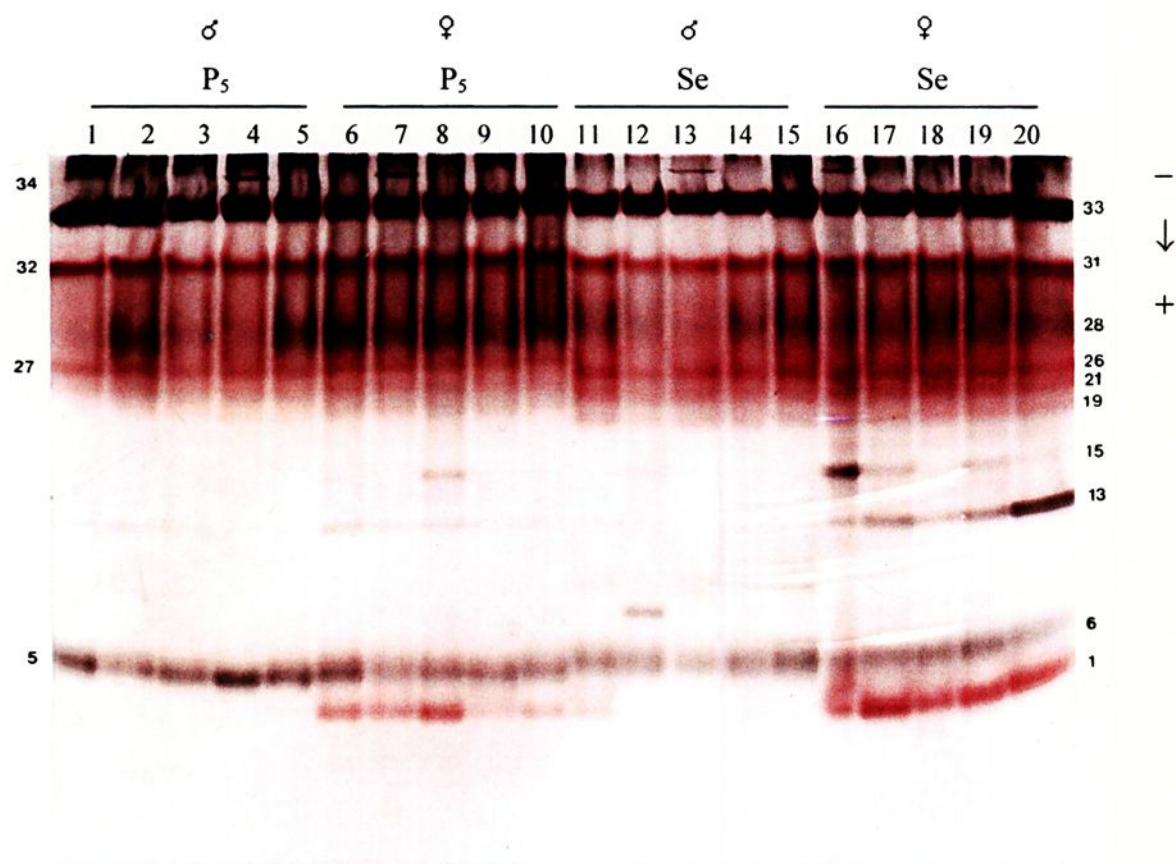


Figura 2. Padrão de bandas esterásicas das linhagens P₅ (*D. prosaltans*) e Se (*D. septentriosaltans*).

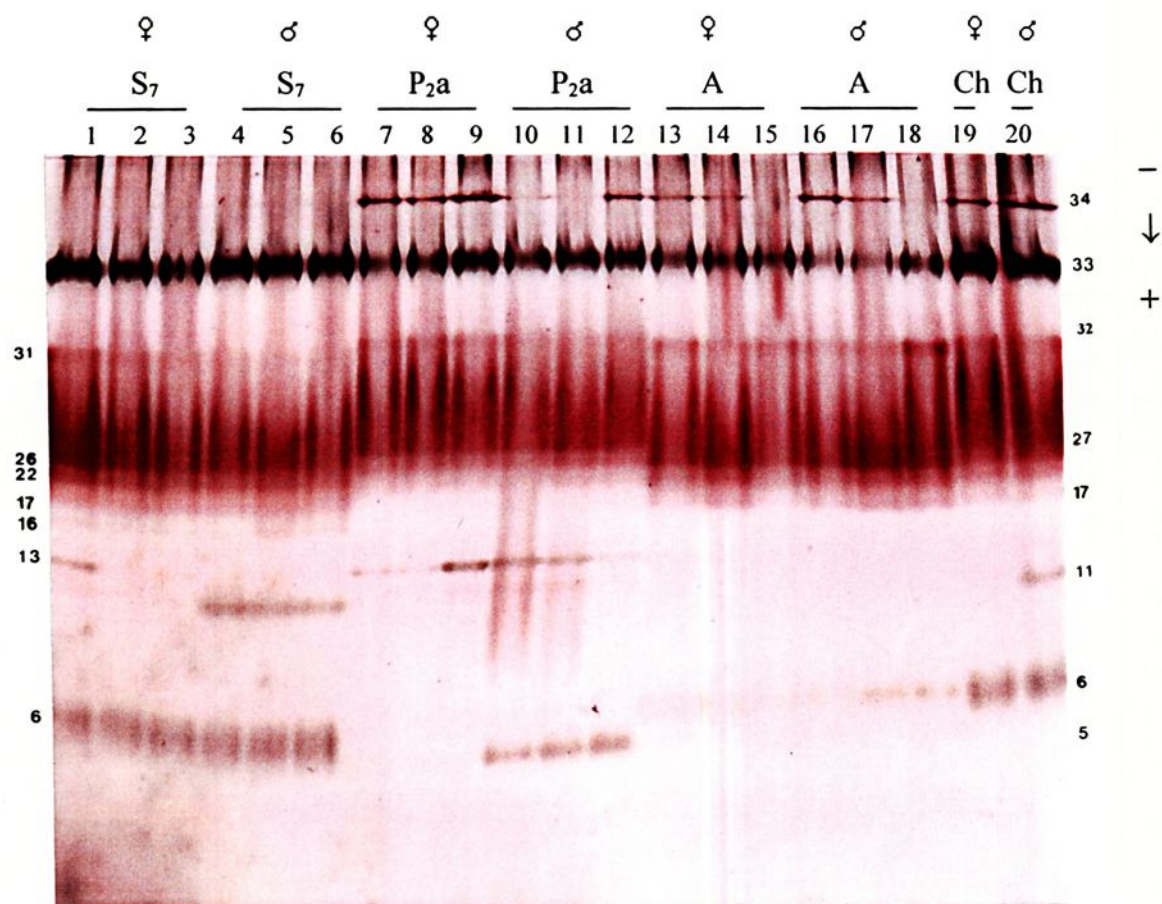


Figura 3. Padrão de bandas esterásicas das linhagens S₇, Ch (*D. saltans*), P_{2a} (*D. prosaltans*) e A (*D. austrosaltans*).

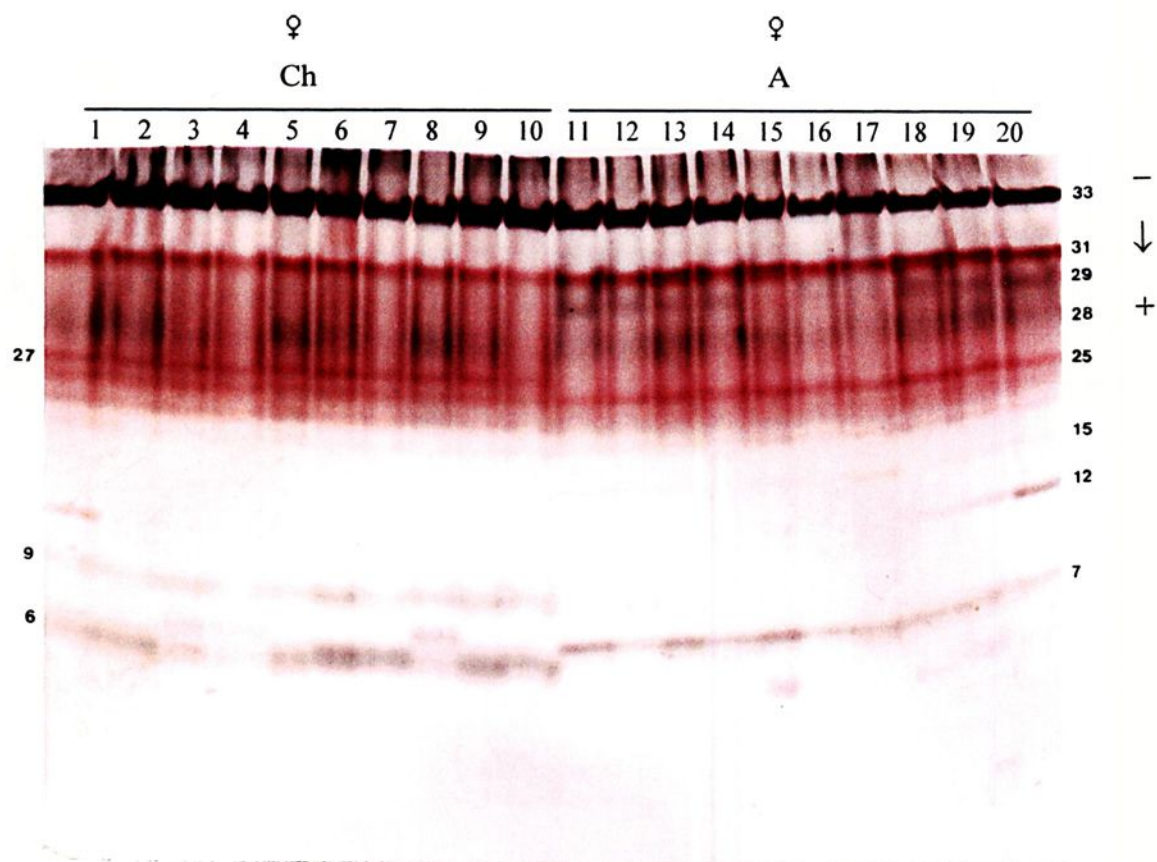


Figura 4. Padrão de bandas esterásicas das linhagens Ch (*D. saltans*) e A (*D. austrosaltans*).

Tabela 2. Presença das bandas macho-específicas, com respectivas frequências (%), nas linhagens analisadas.

Espécies	Linhagens	Bandas		
		11	14	18
<i>D. saltans</i>	S ₁		100	7,5
	S _{2a}	18	22	
	S ₃	30		
	S ₇	100		
	S _M	100		100
	Ch	80		10
<i>D. septentriosaltans</i>	Se	100		1,2

Figura 5. Bandas observadas exclusivamente em machos: banda 11, nas linhagens de *D. septentriosaltans* (Se) e de *D. saltans* (S_{2a}); banda 14, nas linhagens de *D. saltans* (S₁ e S_{2a}).

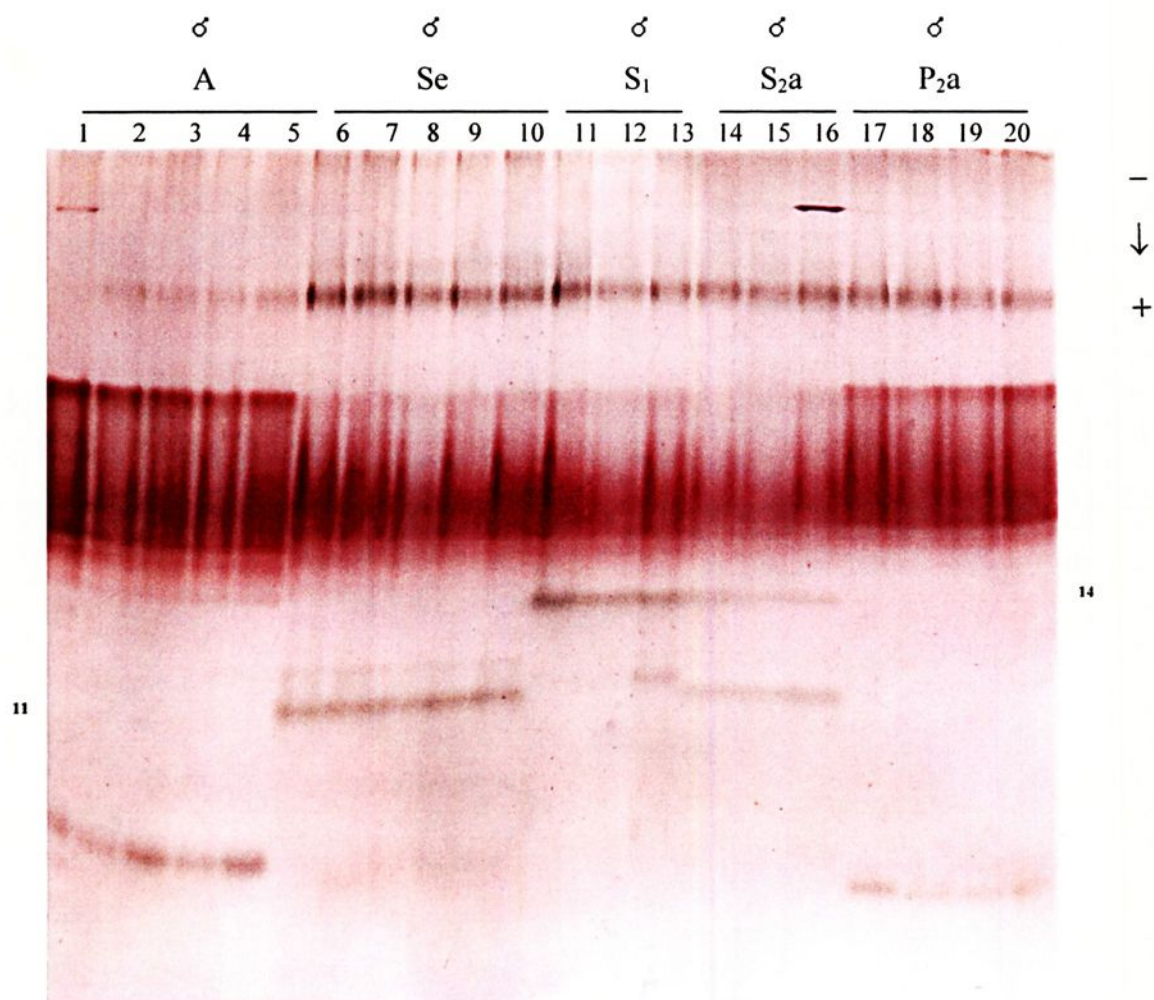


Figura 5. Bandas observadas exclusivamente em machos: banda 11, nas linhagens de *D. septentrionsaltans* (Se) e de *D. saltans* (S_{2a}); banda 14, nas linhagens de *D. saltans* (S₁ e S_{2a}).

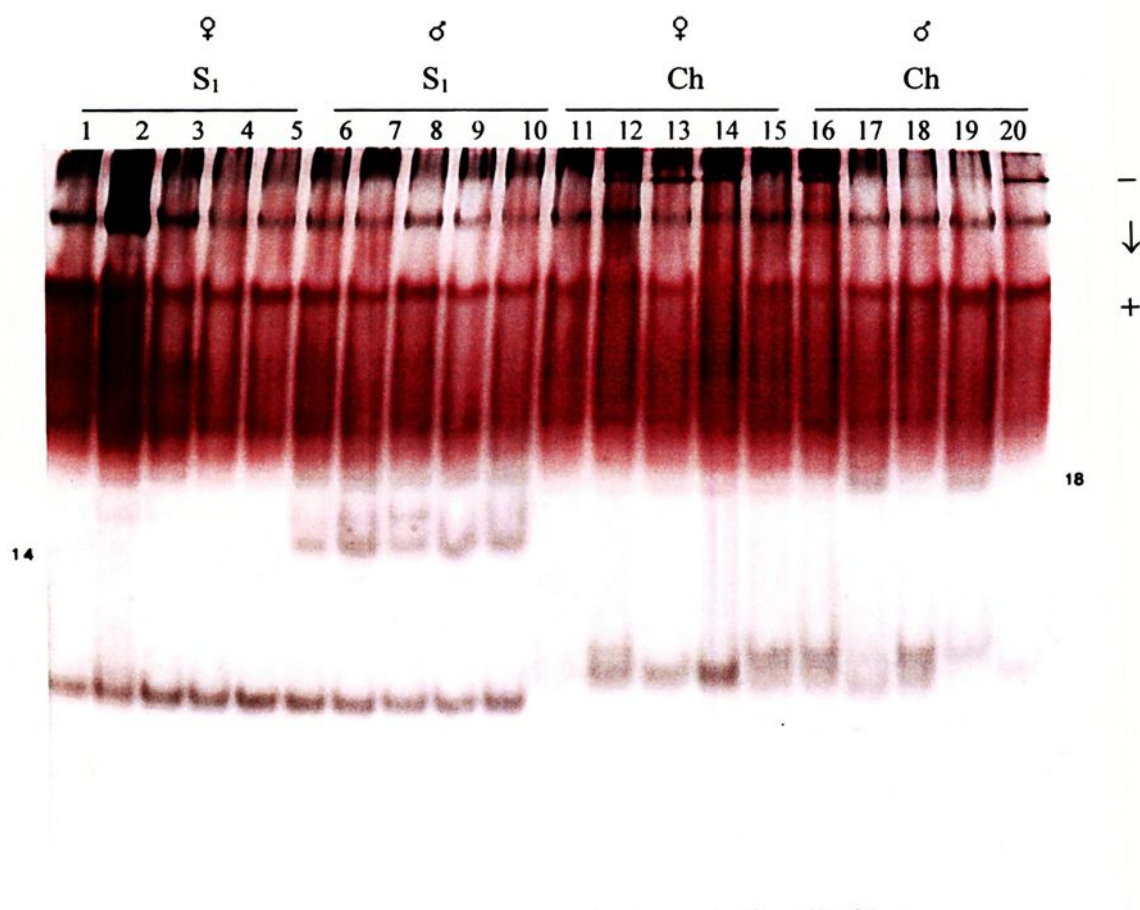


Figura 6. Bandas observadas exclusivamente em machos: banda 14, na linhagem S₁ e banda 18, nas linhagens S₁ e Ch. As duas são linhagens de *D. saltans*.

linhagens das quatro espécies. As bandas 1 (β -esterase), 13 e 28 (α -esterases) e 34 (α/β -esterase) foram observadas em todas as linhagens e espécies, mas não em todos os indivíduos.

A banda 12 (α -esterase) foi observada em todas as espécies, mas não em todas as linhagens de *D. prosaltans* e *D. saltans*.

A **Tabela 3** apresenta as bandas que apareceram com exclusividade em uma ou outra das espécies. *D. prosaltans* mostrou três (bandas 5, 30 e 32), *D. saltans*, seis (bandas 3, 4, 8, 14, 16, e 24), *D. septentriosaltans* mostrou duas (bandas 2 e 19) e *D. austrosaltans* quatro (bandas 7, 20, 23 e 29).

A **Tabela 4** apresenta as bandas partilhadas, incluindo-se as comuns a todas as espécies (bandas 1, 12, 13, 15, 28, 33 e 34). Cinco bandas foram comuns apenas a *D. saltans* e *D. septentriosaltans* (bandas 6, 11, 18, 21 e 26), quatro foram comuns apenas a *D. prosaltans* e *D. saltans* (bandas 9, 10, 22 e 27), uma foi comum a *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. austrosaltans* (banda 25), uma foi comum a *D. saltans* e *D. austrosaltans* (banda 17) e uma foi comum a *D. saltans*, *D. septentriosaltans* e *D. austrosaltans* (banda 31).

As bandas mostraram diferença, quanto à espessura e intensidade de coloração, (a) entre indivíduos de mesma linhagem, (b) entre linhagens de mesma espécie, (c) entre espécies diferentes e mesmo (d) entre os sexos. As **Figuras 7 a 10** apresentam géis, onde essas diferenças podem ser observadas, enquanto as **Figuras 11 e 12** mostram, em gráfico, obtido por análise de imagem, uma quantificação, embora não precisa, dessa diferença, avaliada pela intensidade dos tons de cinza, que correspondem à coloração das bandas nos géis.

As **Figuras 7 a 10** mostram algumas bandas que diferiram entre os sexos. São as bandas α -esterásica 5, nas linhagens P_4 , P_5 , P_{MS} e P_{Est} , de *D. prosaltans*, α -esterase 6, na linhagem S_7 , de *D. saltans*, α -esterase 7, na linhagem A, de *D. austrosaltans* e a banda β -esterásica 1, nas linhagens P_5 e Se, de *D. septentriosaltans*. As bandas 5 e 7 apresentaram-se mais intensamente coradas nos machos que nas fêmeas (**Figuras 7 a 9**), enquanto as bandas 6 e 1 apresentaram-se mais intensamente coradas nas fêmeas

Tabela 4. Bandas partilhadas pelas espécies analisadas.

Tabela 3. Bandas exclusivas de cada espécie analisada.

Bandas	Espécies			
	<i>D. prosaltans</i>	<i>D. saltans</i>	<i>D. septentriosaltans</i>	<i>D. austrosaltans</i>
32	_____			
30	_____			
29				_____
24		_____		
23				_____
20				_____
19			_____	
16		_____		
14		_____		
8		_____		
7				_____
5	_____			
4		_____		
3		_____		
2			_____	

Tabela 4. Bandas partilhadas pelas espécies analisadas.

Bandas	Espécies			
	<i>D. prosaltans</i>	<i>D. saltans</i>	<i>D. septentriosaltans</i>	<i>D. austrosaltans</i>
34				
33				
31				
28				
27				
26				
25				
22				
21				
18				
17				
15				
13				
12				
11				
10				
9				
6				
1				

Figura 7. Diferença de espessura e intensidade de coloração da banda α -esterásica 5, entre fêmeas machos das linhagens P₁ e P₂ de *D. prosaltans*.

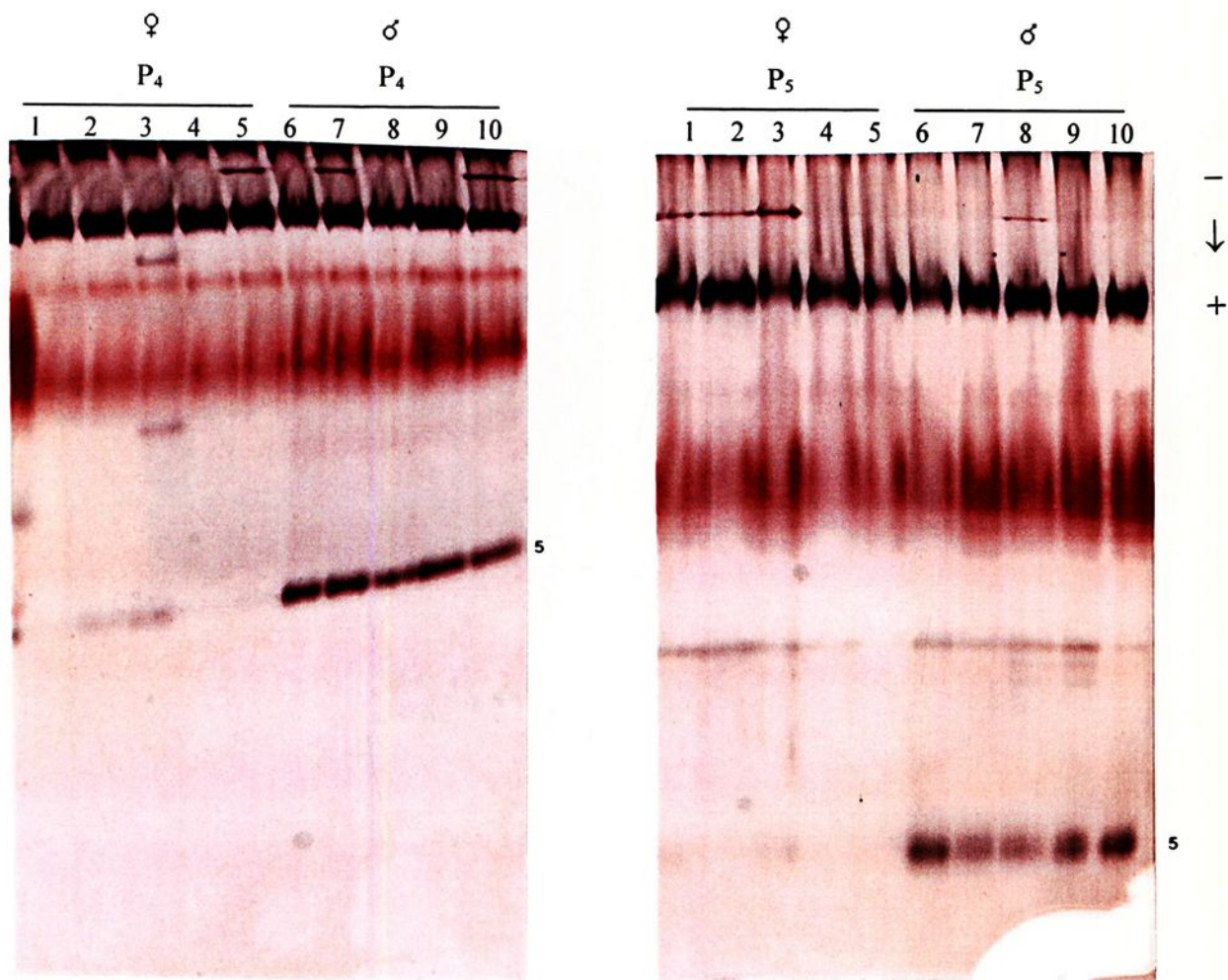


Figura 7. Diferença de espessura e intensidade de coloração da banda α -esterásica 5, entre fêmeas e machos das linhagens P₄ e P₅ de *D. prosaltans*.

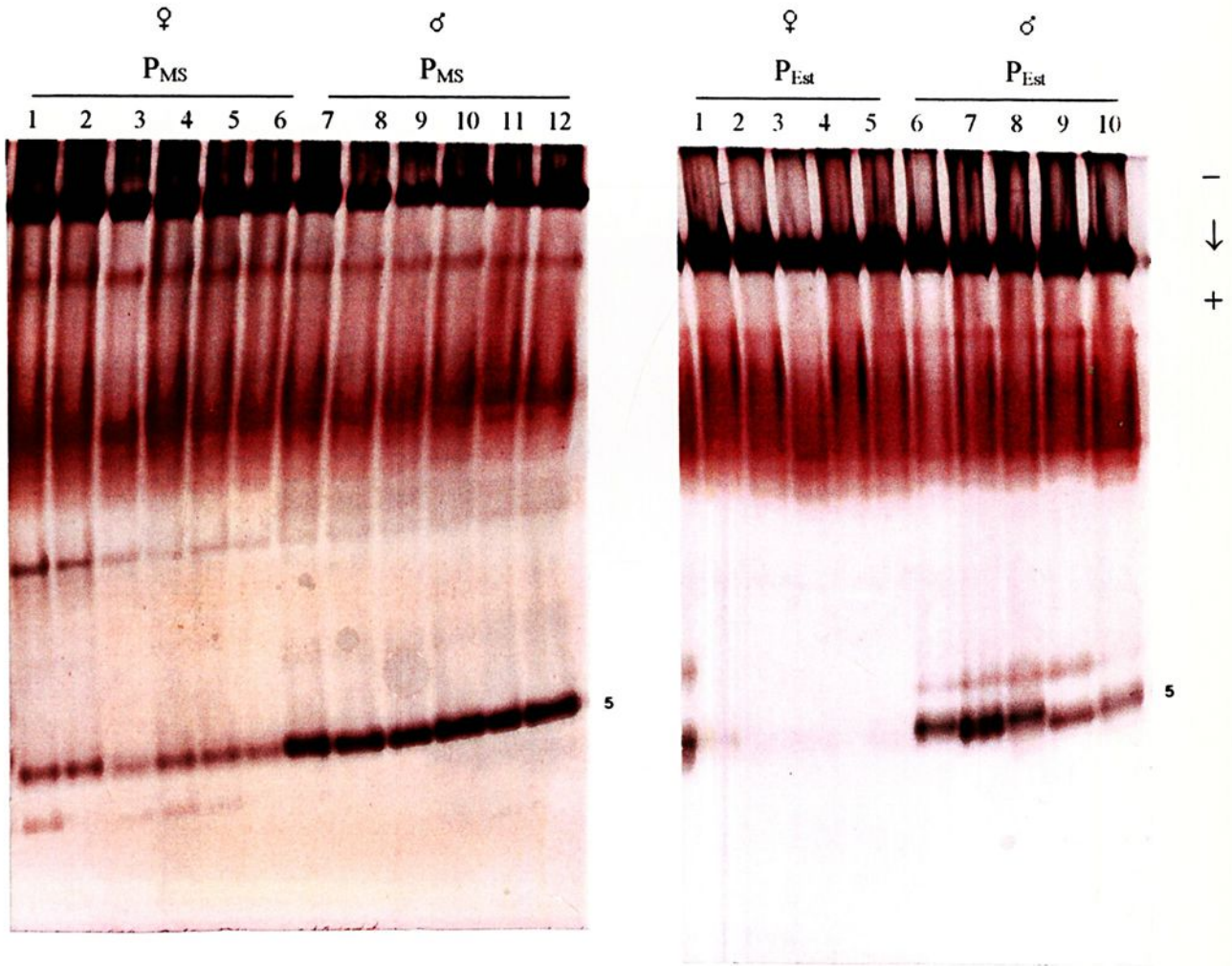


Figura 8. Diferença de espessura e intensidade de coloração da banda α -esterásica 5, entre fêmeas e machos das linhagens P_{MS} e P_{Est} de *D. prosaltans*.

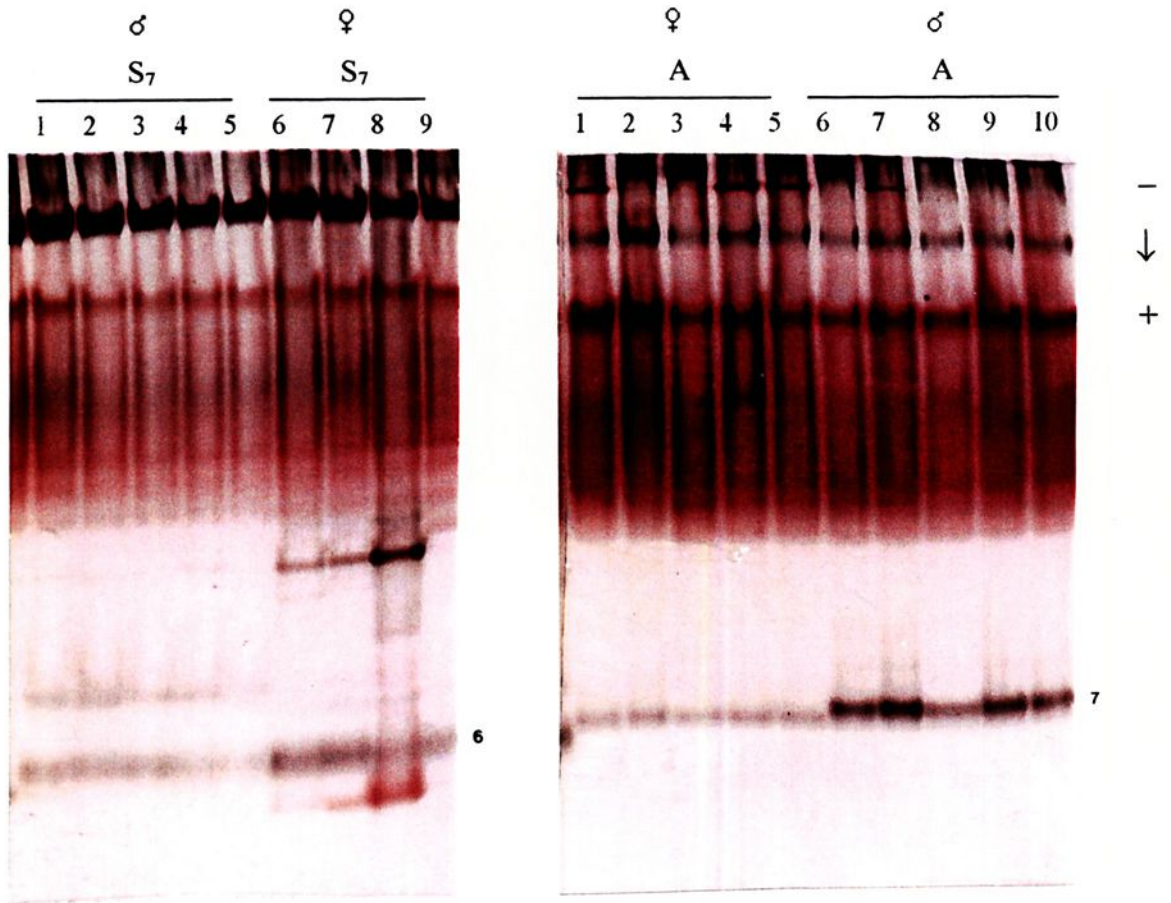


Figura 9. Diferença de espessura e intensidade de coloração das bandas α -esterásicas 6 e 7, respectivamente na linhagem S₇, de *D. saltans* e na linhagem A, de *D. austrosaltans*.

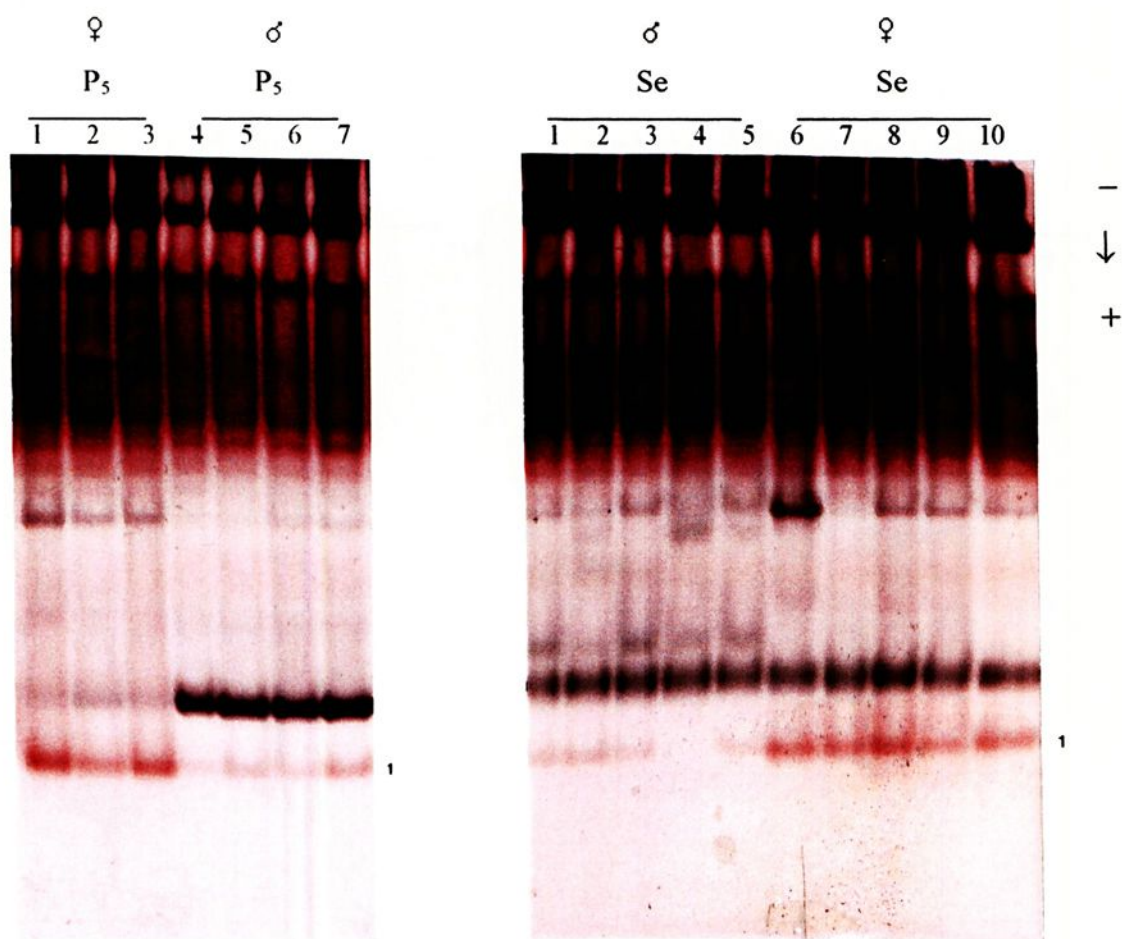


Figura 10. Diferença de espessura e intensidade de coloração da banda β -esterásica 1 entre os indivíduos analisados das linhagens P₅ de *D. prosaltans* e Se de *D. septentriosaltans*.

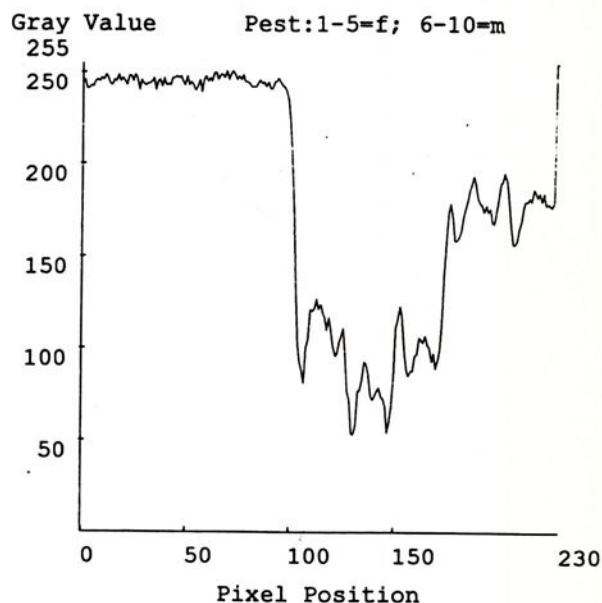
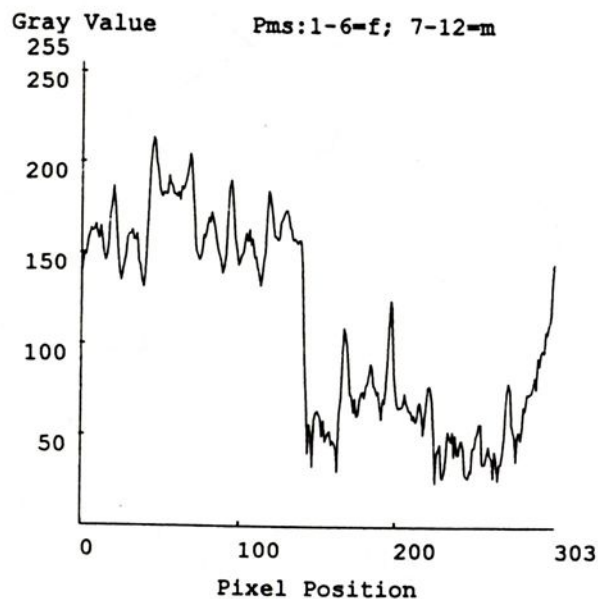
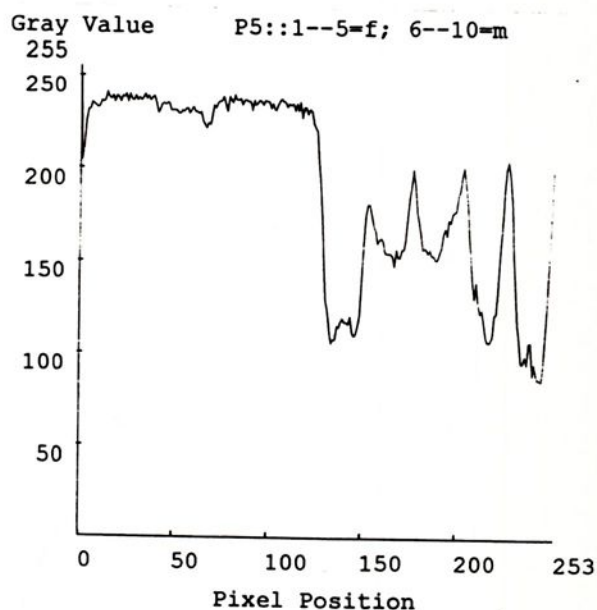
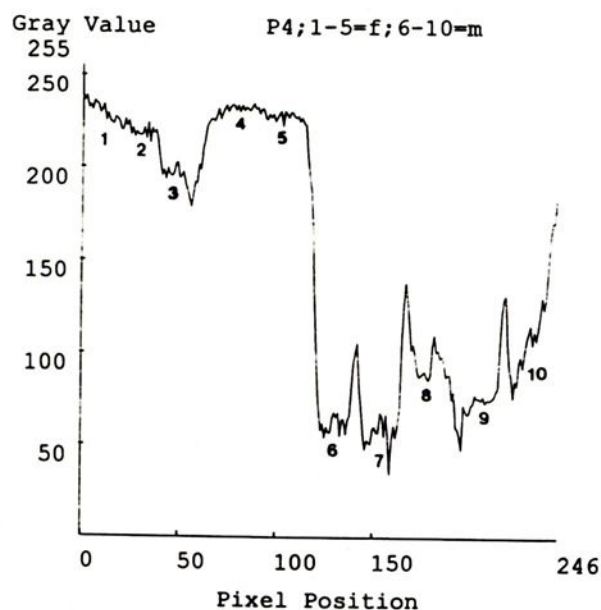


Figura 11. Gráfico linear indicativo da intensidade de coloração obtido por análise de imagem. Banda α -esterásica 5. Linhagens P₄ e P₅ (correspondente à Figura 7); e linhagens P_{MS} e P_{Est} (correspondente à Figura 8). No gráfico esquerdo superior, os números no traçado da linha são indicativos das bandas analisadas. Os outros gráficos desta e das demais Figuras seguem o mesmo esquema.

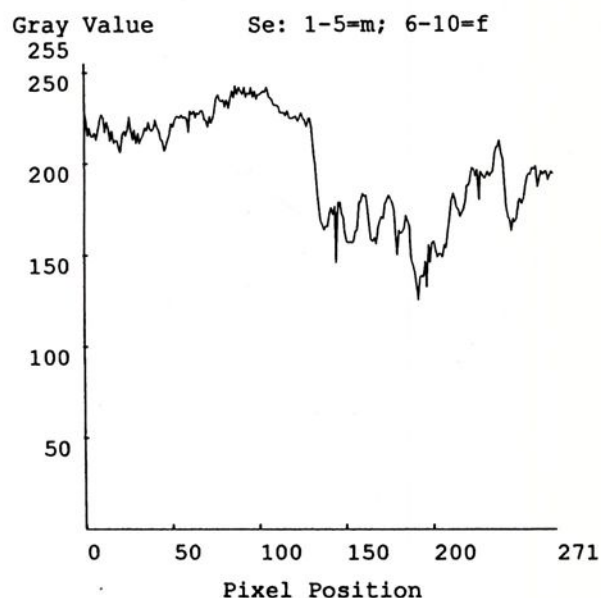
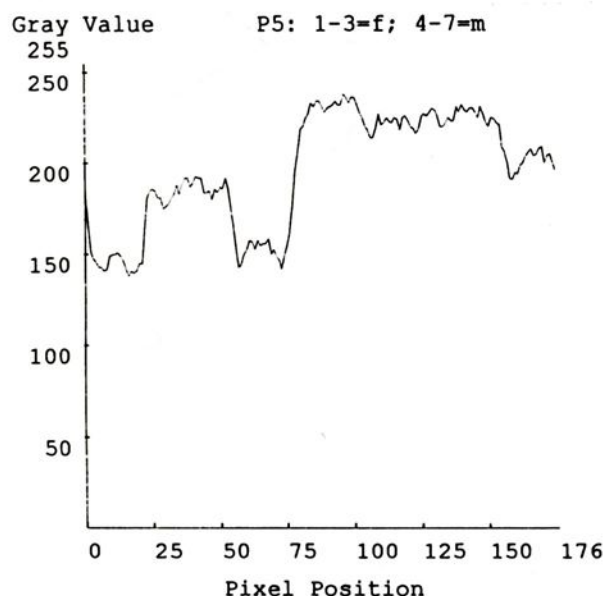
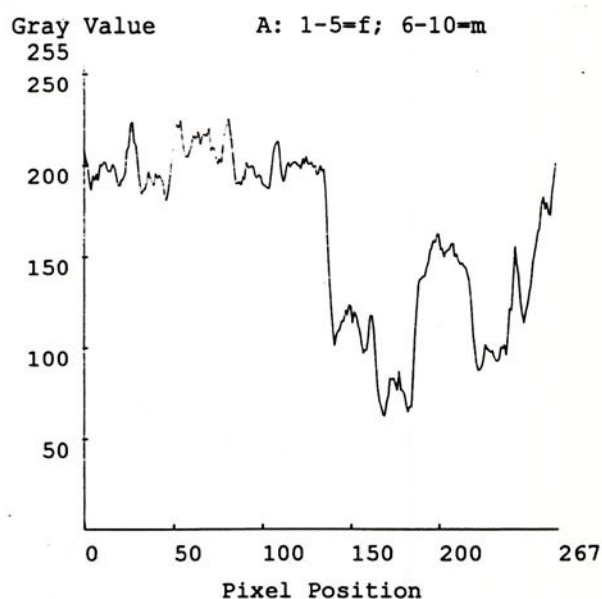
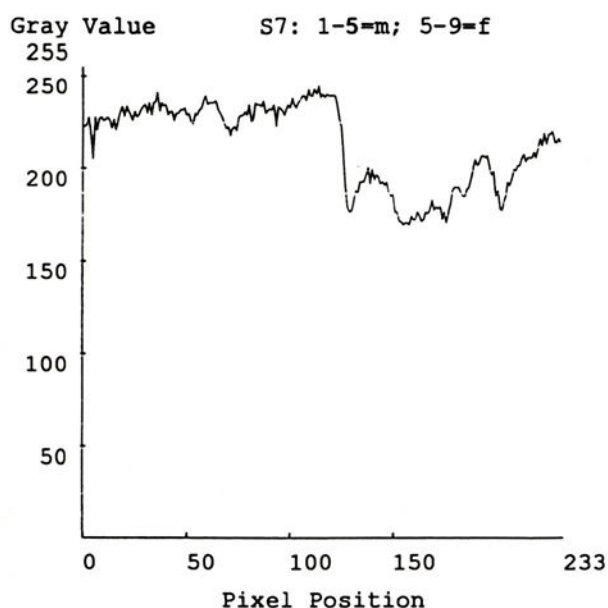


Figura 12. Gráfico linear indicativo da intensidade de coloração, obtido por análise de imagem. Linhagem S₇ (banda α -esterásica 6) e linhagem A (banda α -esterásica 7), correspondentes à Figura 9. Linhagens P₅ e Se, banda β -esterásica 1, correspondente à Figura 10.

que nos machos (**Figuras 9 e 10**).

A **Figura 11** apresenta os gráficos de perfil linear correspondentes aos géis das **Figuras 7 e 8**. Conforme descrito em Materiais e Métodos, o Programa utilizado para análise é capaz de reconhecer 255 tons, do preto ao branco, estabelecendo o valor mínimo (0) para cor preta e o máximo (255) para cor branca. No caso presente, o valor em pixels traduz a intensidade dos tons de coloração das bandas, transformados em tons de cinza. Como a intensidade de coloração das bandas é entendida como uma medida da atividade enzimática, a quantificação em pixels de uma mesma banda em cada indivíduo mostra a variação dessa intensidade nos indivíduos analisados em cada gel. Assim, na **Figura** mencionada, mostra que a atividade da banda 5 nas fêmeas, é bastante baixa atingindo ou aproximando do valor de cinza igual a 250 pixels, nas linhagens P_4 , P_5 , e P_{Est} . Nos machos das mesmas linhagens os valores variam entre 50 e 100 para P_4 , entre 100 e 150 para P_5 e entre 50 e 175 para P_{Est} . Na linhagem P_{MS} , a diferença de atividade entre os sexos é menor, com os valores em pixels, para as fêmeas oscilando, aproximadamente entre 150 e 200. Quanto aos machos, a mesma linhagem P_{MS} , apresentou os valores de cinza oscilando entre 30 e 100 pixels, aproximadamente.

Quanto à **Figura 12**, que se refere aos gráficos correspondentes aos géis das **Figuras 9 e 10**, observa-se uma diferença de atividade menos acentuada entre fêmeas e machos do que as observadas nas figuras anteriores.

Destacamos também uma situação de diferença entre duas linhagens de espécies diferentes, Se e Ch, envolvendo a banda 6. Neste caso, a intensidade é maior para os indivíduos dos dois sexos de Se em relação a Ch (**Figura 13**). Observa-se que há também uma ligeira diferença de intensidade entre os sexos em cada linhagem. O gráfico de perfil linear da **Figura 14** apresenta a quantificação da variação da atividade dessa banda. Neste caso, a diferença de atividade não é muito acentuada, mas permite diferenciar, no conjunto, as duas linhagens.

É possível verificar ainda, em todos os gráficos apresentados, a variação de atividade das bandas entre indivíduos de mesmo sexo e mesma linhagem.



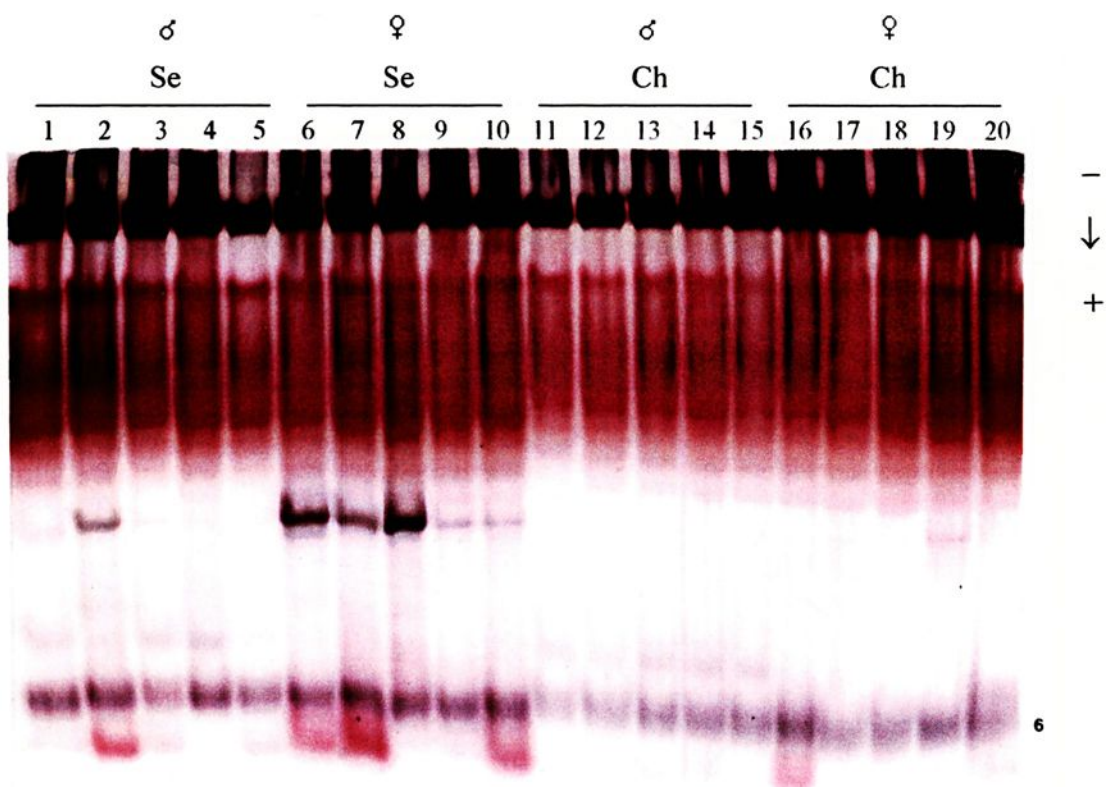


Figura 13. Diferença de espessura e intensidade de coloração da banda α -esterásica 6 entre os indivíduos analisados das linhagens Se, de *D. septentrionsaltans* e Ch de *D. saltans*.

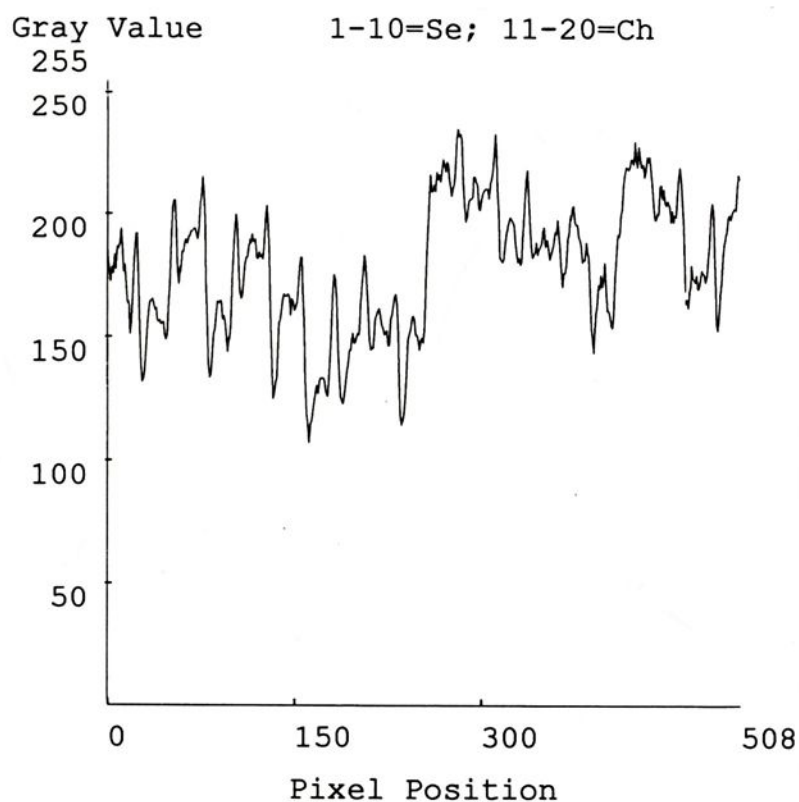


Figura 14. Gráfico linear indicativo da intensidade de coloração, obtido por análise de imagem. Banda α -esterásica 6, na comparação das linhagens Se e Ch, correspondentes à **Figura 13.**

A **Figura 15** mostra o padrão de esterases do controle externo (*D. melanogaster*, linhagem Canton S), utilizado neste gel junto com quatro linhagens de *D. saltans*. Nessa linhagem foram observadas cinco bandas das quais, duas, pela posição, tom e intensidade de coloração parecem corresponder às bandas 33 e 34 das linhagens analisadas do subgrupo *saltans*. As outras bandas foram denominadas 10', 11' e 30'. Esse controle externo confirma a coerência dos padrões observados, que já era possível ver pela análise das próprias linhagens, objeto do presente estudo.

2. Análise do uso dos inibidores: malathion, sulfato de eserina e pCMB

O tratamento pelo malathion (**Figura 16**), inibiu todas as bandas β -esterásicas de todas as linhagens analisadas. Foram também inibidas as bandas α -esterásicas da região catódica e a banda 33, também α -esterásica, que é a banda de maior espessura e intensidade de coloração presente nessas linhagens. Um resquício de presença dessa banda, no gel, bem como da banda catódica 5, da linhagem P_{Est}, provavelmente desapareceria com uma solução mais concentrada de malathion.

As bandas macho-específicas 11 e 14, que são α -esterásicas, não mostraram inibição pelo malathion. Também a banda 13, presente em todas as linhagens (embora não em todos os indivíduos), não foi inibida. A banda 34, a mais anódica, embora não tenha atividade muito acentuada, apresentou inibição parcial.

O tratamento com o sulfato de eserina (**Figura 17**), inibiu acentuadamente apenas a banda 33. Um ligeiro efeito foi observado sobre a banda 34. A macho-específica 11 não foi afetada.

Quanto ao pCMB (**Figura 18**), o mesmo não atuou sobre qualquer banda, nas condições utilizadas.

3. Análise do padrão de esterases, no desenvolvimento

No estudo das esterases, no decorrer do desenvolvimento, foram focalizadas as

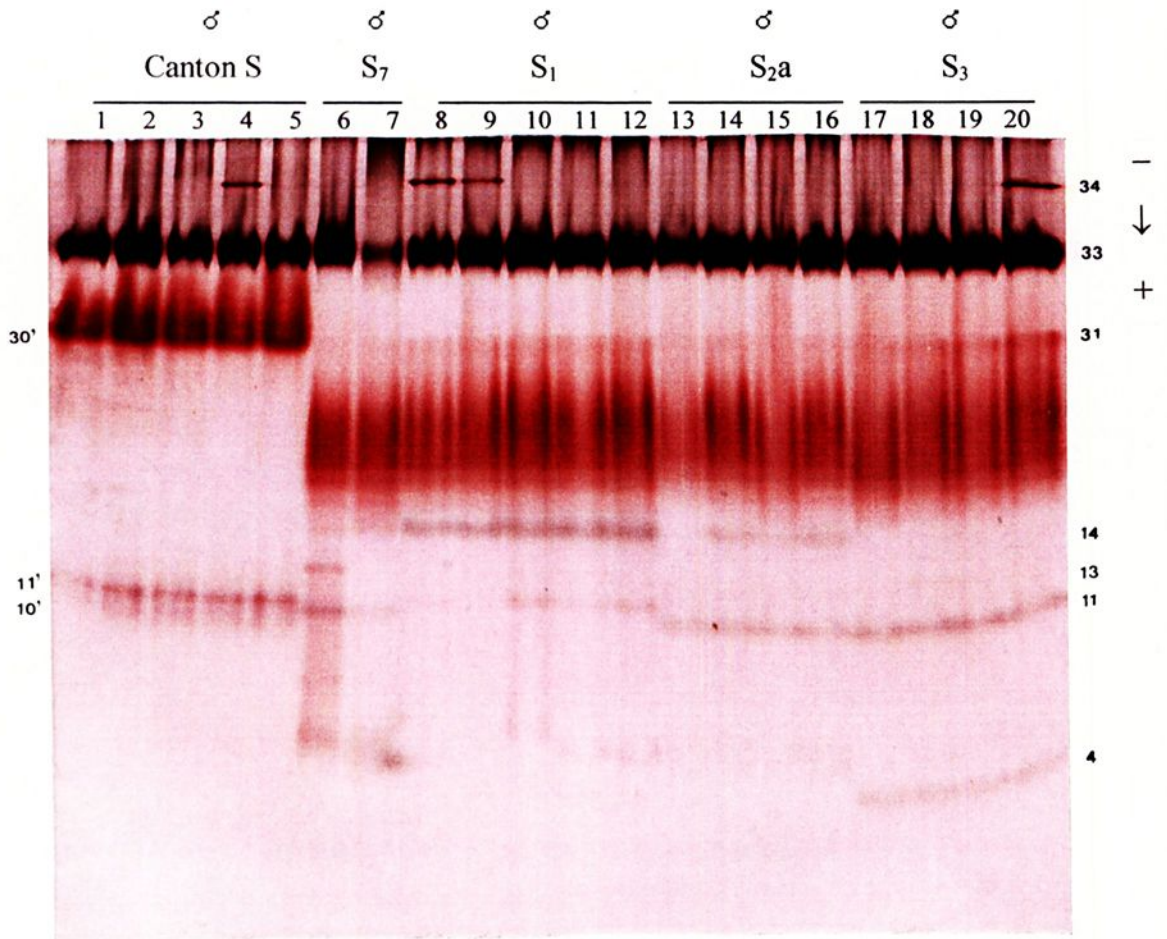
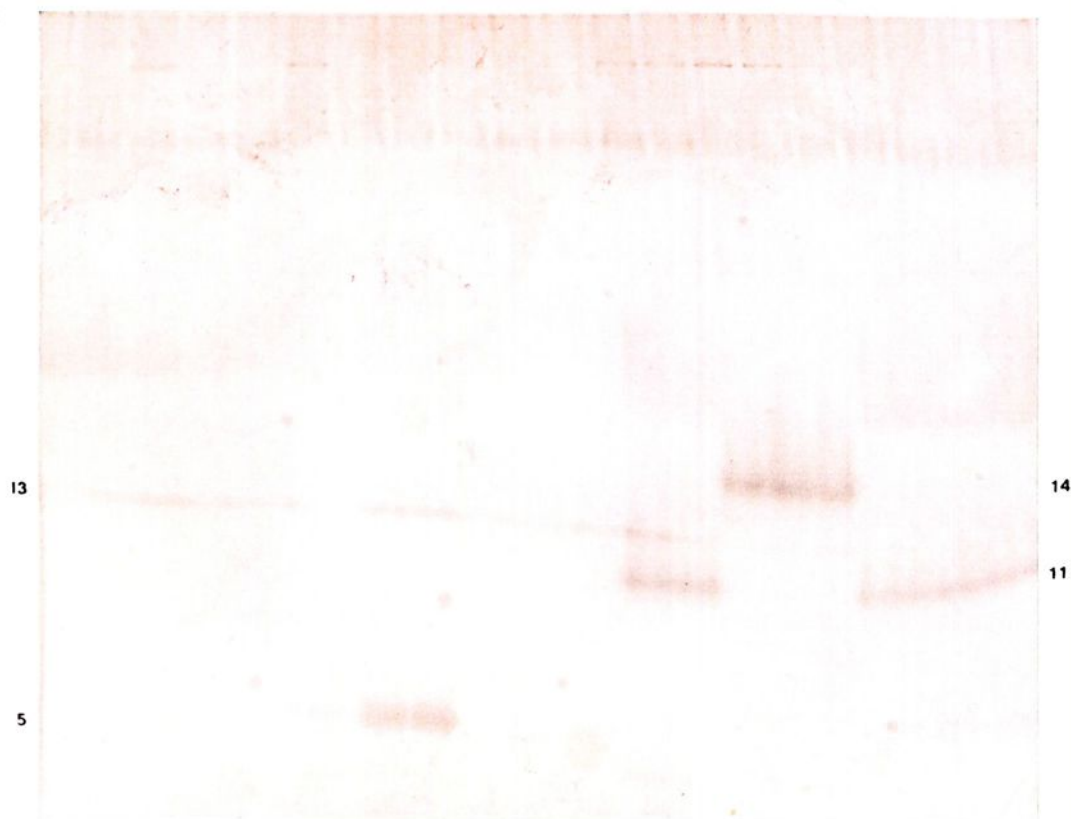
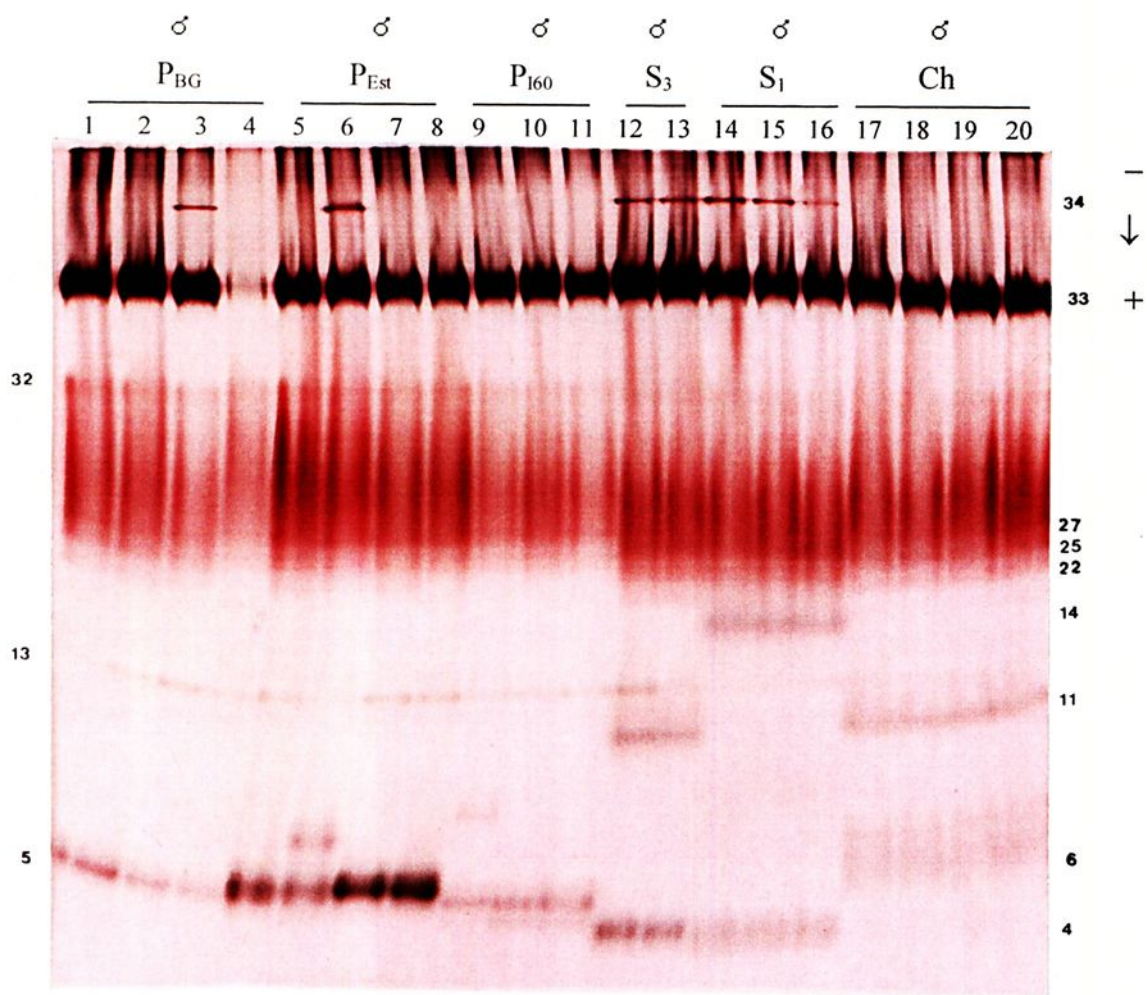


Figura 15. Padrão de bandas esterásicas da linhagem Canton S (*D. melanogaster*) e das linhagens S₇, S₁, S_{2a} e S₃ (*D. saltans*).



Figura 16. Ação do malathion sobre as bandas esterásicas.



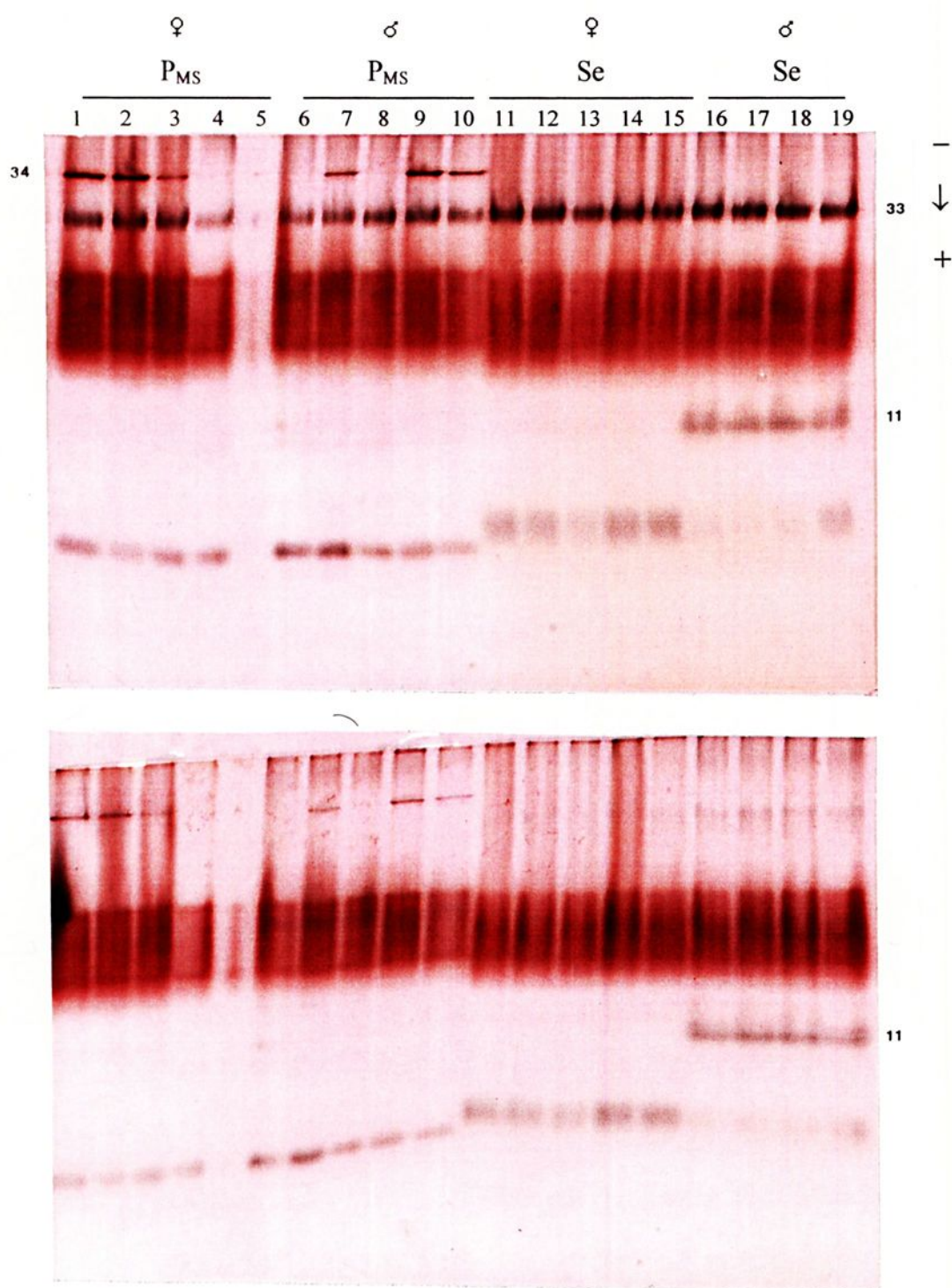
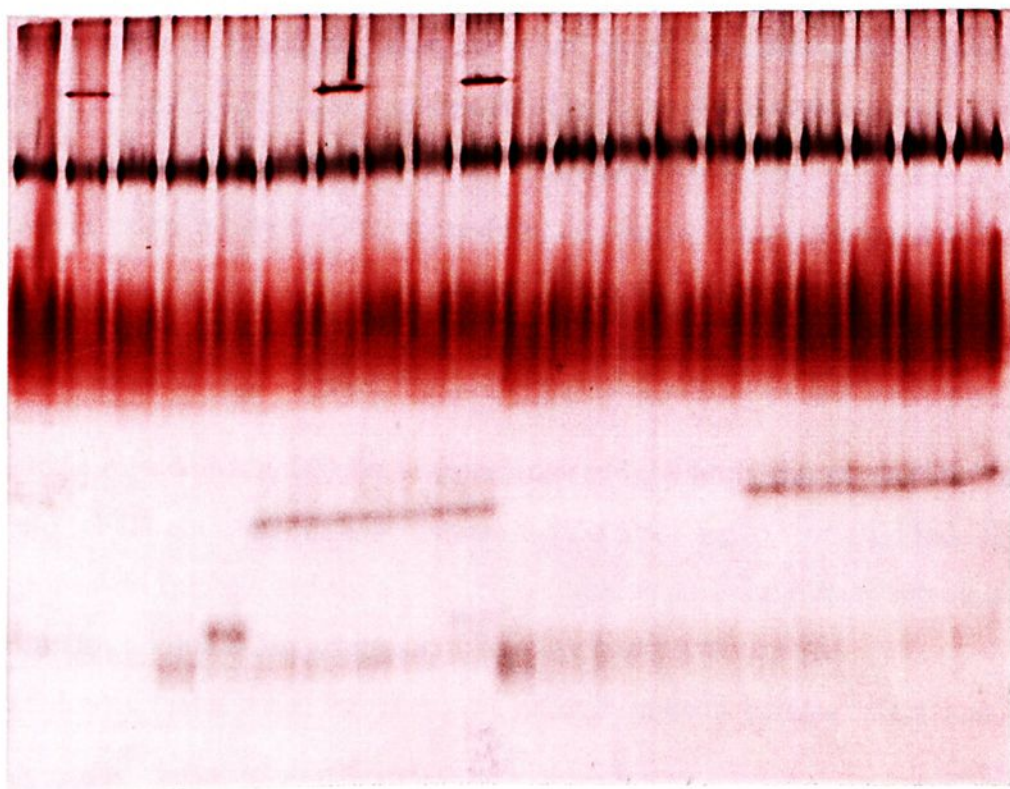
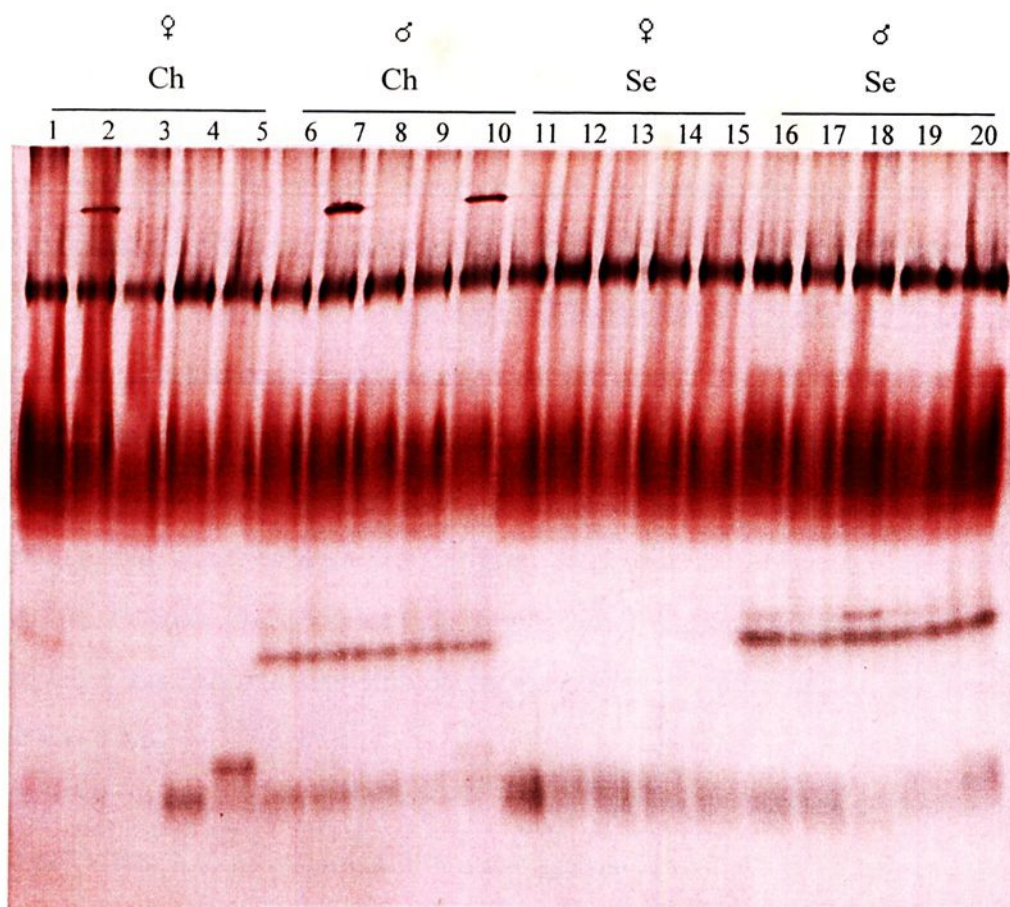


Figura 17. Ação do sulfato de eserina sobre as bandas esterásicas das linhagens P_{MS} (*D. prosaltans*) e Se (*D. septentriosaltans*).



Figura 18. Ação do pCMB sobre as bandas esterásicas.



fases de larva de 3º estágio (L3), pupa (P) e fêmeas (F) e machos (M) adultos. Para ampliar as informações foram também analisados casulos vazios, após a emergência dos imagos (**Figuras 19 a 23**).

Uma observação de ordem geral, é que as larvas de todas as linhagens mostraram ausência das bandas α -esterásicas que caracterizam a extremidade catódica, nos adultos. O mesmo não acontece com a banda β -esterásica 1, presente nessa mesma região, que se manifestou nas larvas de algumas linhagens (P_{Est} , S_{2a} , S_3 , S_7). A banda 33 (α -esterase), que está presente em todos os indivíduos adultos de todas as espécies analisadas, também foi detectada em todas as larvas, nas quais apresenta, porém uma atividade mais baixa, caracterizada por um grau de coloração e espessura menores que nos adultos. As bandas α -esterásicas da região intermediária (bandas 8 a 14) não foram observadas na maioria das linhagens, nessa fase, com exceção da banda 13, presente em P_{160} e S_M .

Na fase de pupa, algumas linhagens manifestaram as bandas β -esterásicas da região mais catódica. São as mesmas linhagens que as apresentaram na fase de larva e mais a P_{BG} . Com relação às bandas α -esterásicas da região intermediária, nessa fase, houve variação entre as linhagens, mas de modo geral, algumas dessas bandas se manifestaram. Em três das linhagens analisadas (Ch , S_{2a} e S_3) as pupas apresentaram a banda macho-específica 11 que já havia sido detectada nos adultos.

Na fase de pupa, a banda 33 se apresentou da mesma forma que nas larvas, com um grau de atividade menor que o dos adultos. Exceção foi observada nas linhagens S_7 , S_1 e A que apresentaram atividade da banda 33, nas pupas, no mesmo nível dos adultos.

No que se refere às bandas β -esterásicas da região intermediária, os padrões são aparentemente iguais em todas as fases, aparentando, porém, menor atividade dessas bandas em pupas do que em larvas e adultos ou aparentando atividade semelhante à das larvas e menor do que a dos adultos.

Os casulos da maioria das linhagens mostraram poucas bandas esterásicas. As

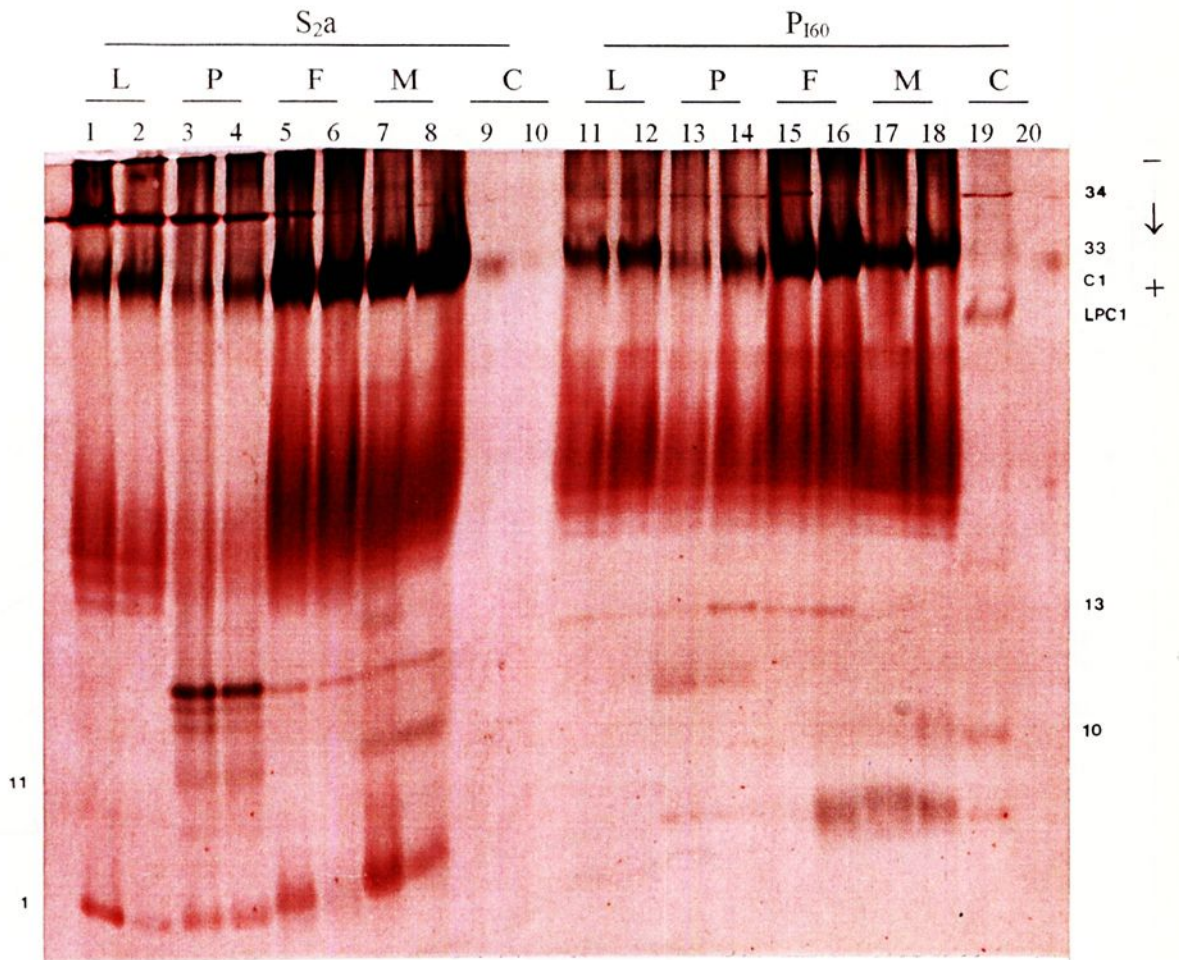


Figura 19. Padrão de bandas esterásicas no desenvolvimento. L=larva; P=pupa; F=fêmea adulta; M=macho adulto e C=casulo vazio da pupa.

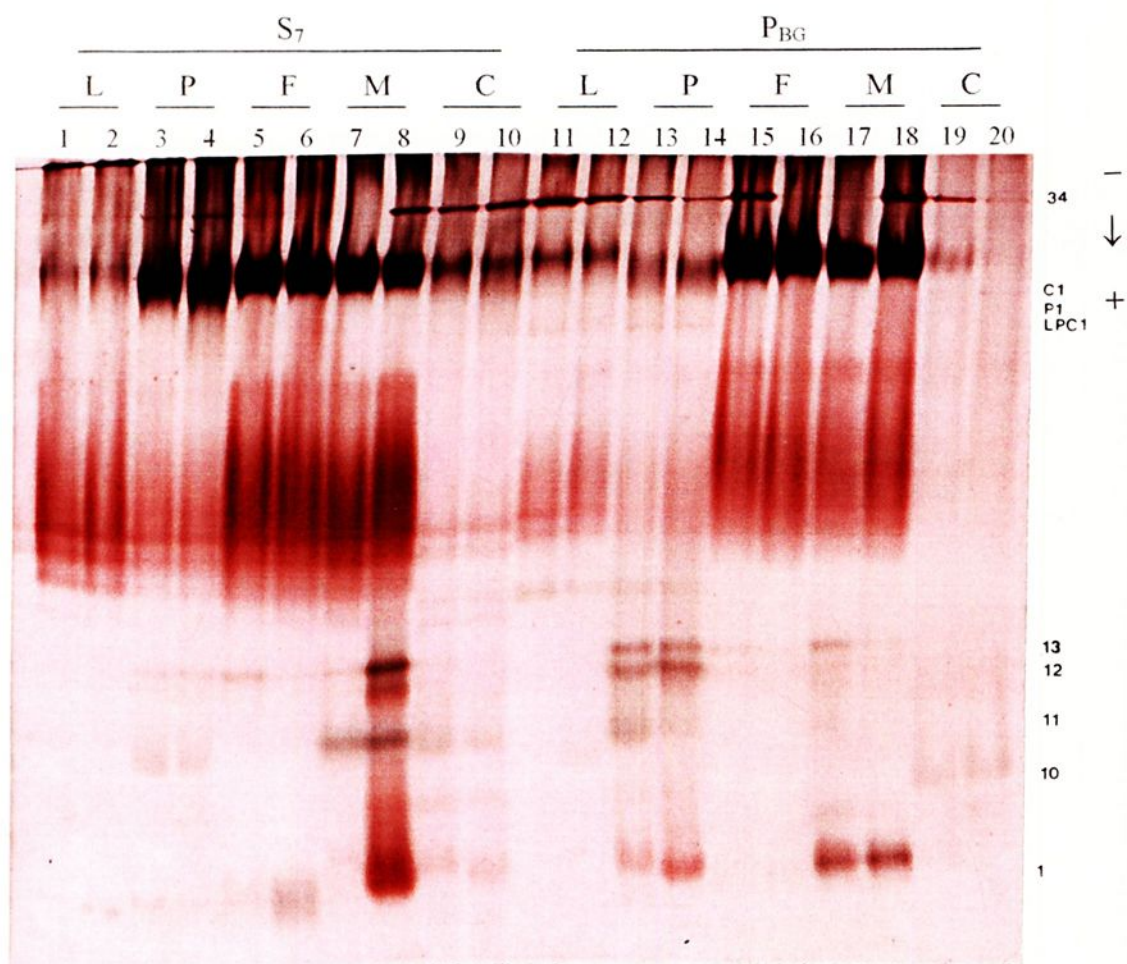


Figura 20. Padrão de bandas esterásicas no desenvolvimento. L=larva; P=pupa; F=fêmea adulta; M=macho adulto e C=casulo vazio da pupa.

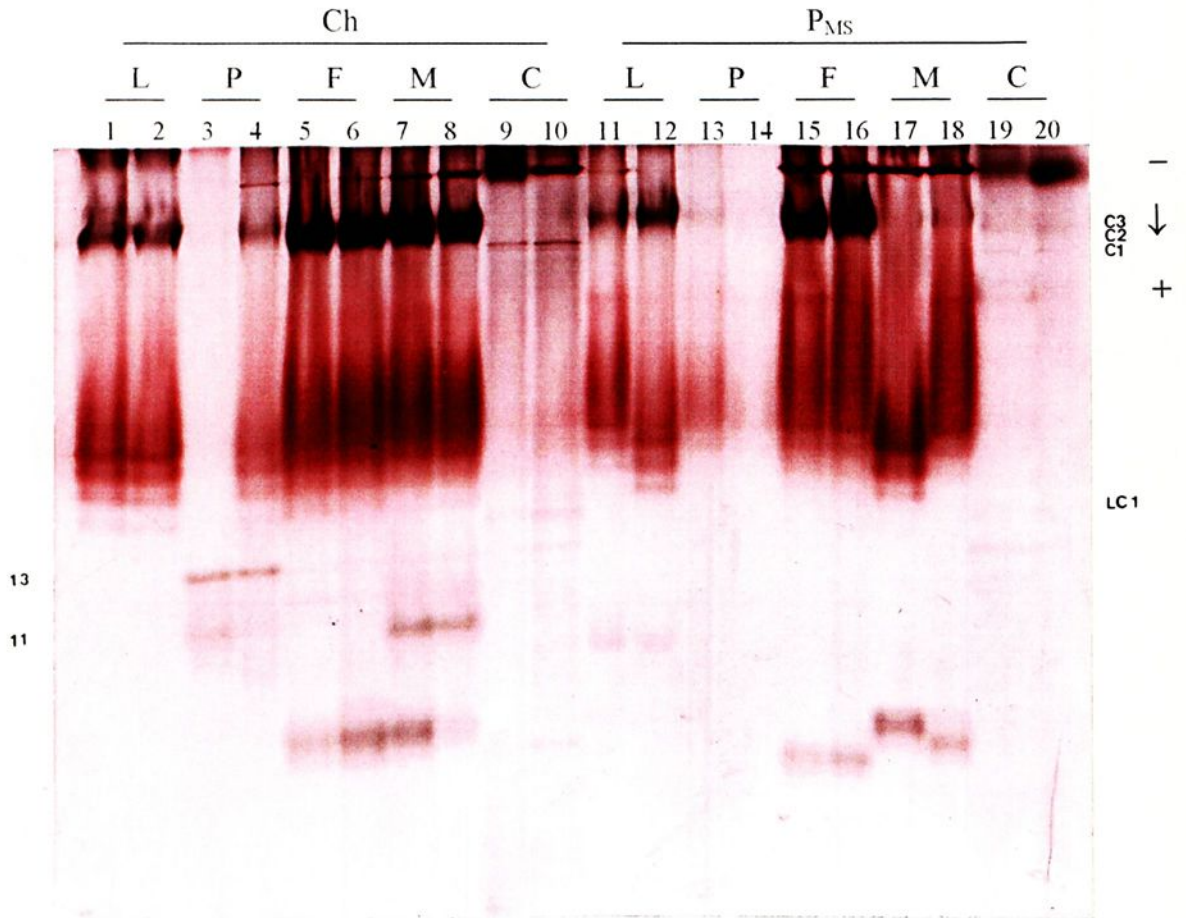


Figura 21. Padrão de bandas esterásicas no desenvolvimento. L=larva; P=pupa; F=fêmea adulta; M=macho adulto e C=casulo vazio da pupa.



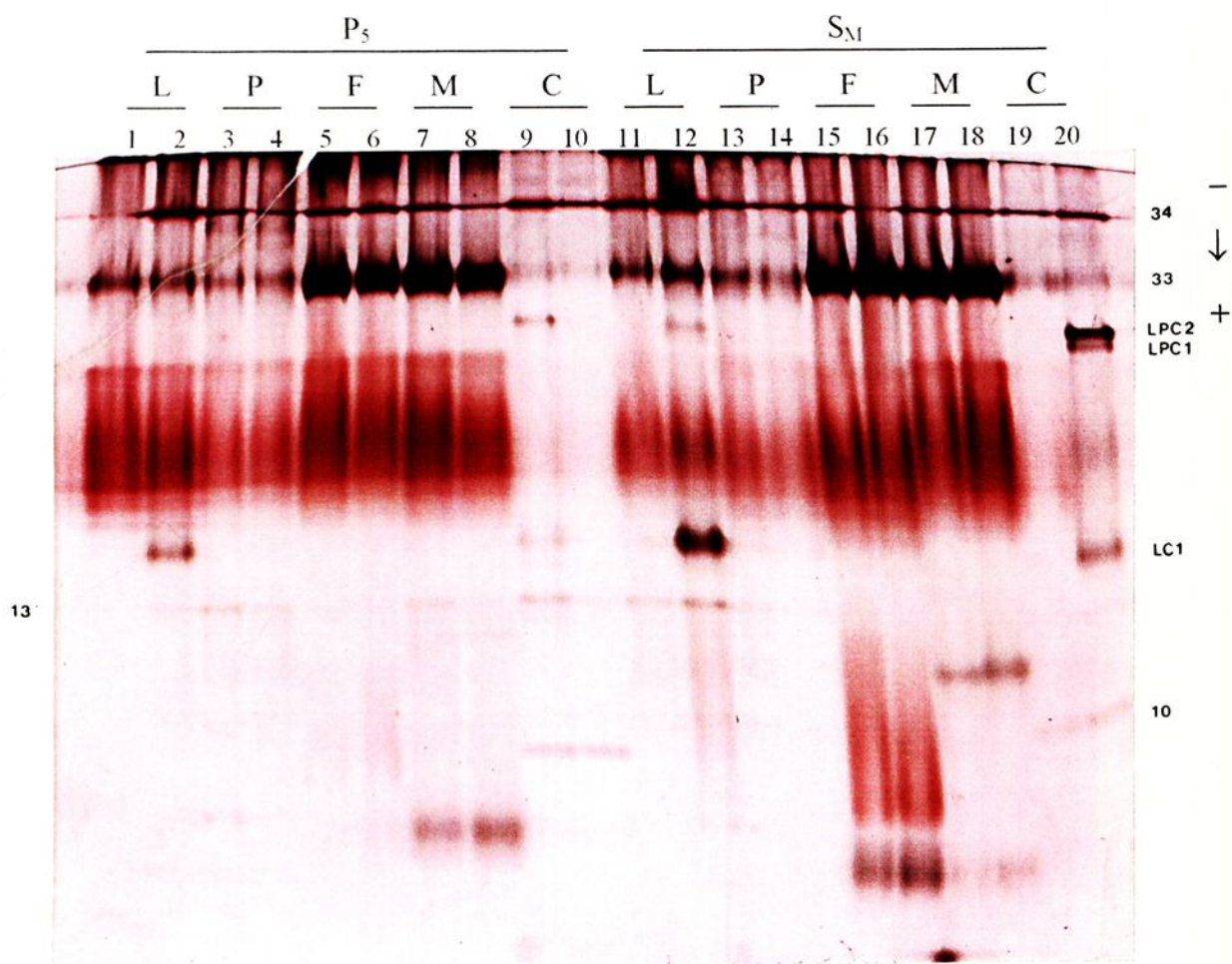


Figura 22. Padrão de bandas esterásicas no desenvolvimento. L=larva; P=pupa; F=fêmea adulta; M=macho adulto e C=casulo vazio da pupa.

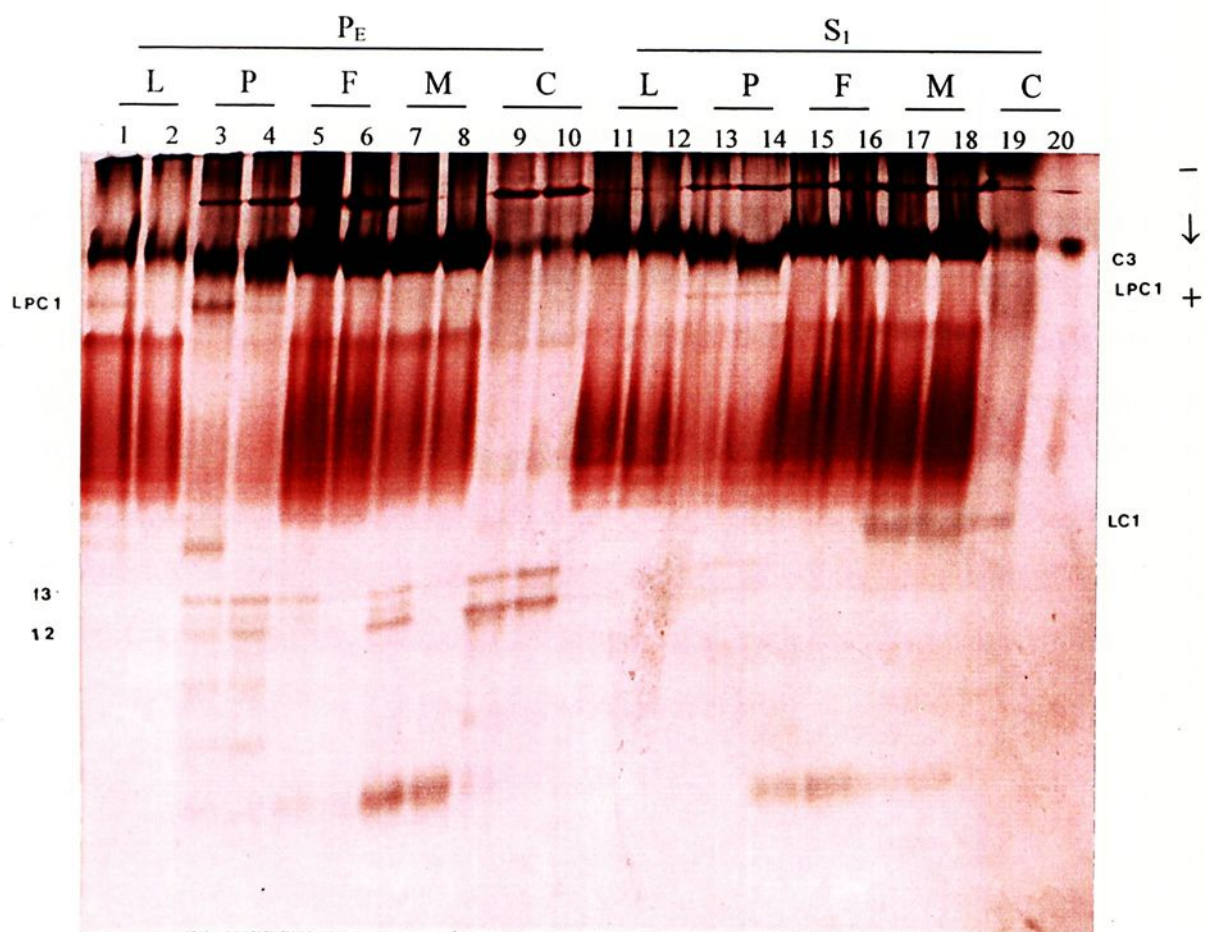


Figura 23. Padrão de bandas esterásicas no desenvolvimento. L=larva; P=pupa; F=fêmea adulta; M=macho adulto e C=casulo vazio da pupa.

bandas da região mais catódica só foram observadas em S_7 , P_{160} e P_E . Na região das bandas β -esterásicas, foi observada a presença de algumas bandas com baixa atividade, acompanhando o padrão da linhagem. Na região intermediária entre a mais catódica e a das β -esterases, observou-se a presença das bandas 10 (P_5 , P_{160} , P_{BG} , S_7 e S_M), 12 (P_{2a} e P_E) e 13 (P_{2a} , P_E , P_5 , P_{Est} , S_7 e A).

Os casulos que apresentaram o maior número de bandas foram os de S_7 em que foram observadas várias bandas de atividade baixa em todas as regiões do gel. A banda 33 foi observada nos casulos de todas as linhagens, apresentando-se com atividade baixa ou muito baixa.

Foram observadas algumas bandas específicas das fases de larva e pupa e também de casulos (**Tabela 5**). Duas dessas bandas ocorreram nessas três situações. São as bandas LPC1 e LPC2. Essas duas bandas foram observadas apenas em linhagens de *D. prosaltans* e *D. saltans*. Uma banda, P_1 , foi encontrada exclusivamente nas pupas de uma linhagem de *D. prosaltans* (P_{BG}), e três bandas, C_1 , C_2 e C_3 foram encontradas exclusivamente em casulos de linhagens de *D. prosaltans*, de *D. saltans* e da linhagem de *D. austrosaltans*. Uma banda, denominada LC_1 , próxima da região das β -esterásicas, foi observada exclusivamente em larvas e casulos.

4. Análise do padrão dos híbridos interespecíficos

Cruzamentos interespecíficos foram realizados entre as linhagens compatíveis, com base nos dados de Bicudo (1973 a). A **Tabela 6** apresenta os resultados obtidos nesses cruzamentos, preparados em massa. Os descendentes obtidos foram submetidos à análise para estudo do padrão de bandas esterásicas. Nos géis foram utilizados como controle, em geral, uma ou duas amostras das moscas parentais. Isto significa que outros pais poderiam estar transportando bandas encontradas nos géis analisados. Por isso, os híbridos foram analisados em comparação com os dados das linhagens parentais. A descrição desses padrões é feita a seguir.

Tabela 5. Bandas esterásicas observadas em larvas, pupas e casulos, que não haviam sido detectadas nos adultos.

Bandas	Fase do desenvolvimento ou estrutura		Linhagens	
	F	M	F	M
C3	P _{MS}		Ch, S ₁ , P _{MS}	19
C2	S ₁		Ch	18
C1	S ₁		Ch, P _{MS} , P _{BG} , P ₁₆₀ , P _{2a} , A	
P1	P ₃		P _{BG}	6
LPC2	P ₄		S _M	8
	Se		P ₄	2
	P _{2a}		S _M	8
LPC1	S ₁		S _M , P _{BG} , P _E	0
	P ₄		P _{BG} , P _E , P ₄ , S ₁	
	S ₁		P ₅ , S _M , P ₁₆₀	0
LC1	Ch		P ₅ , S _M	10
	P ₄		P ₅ , S _M , S ₁ , Ch	

Híbridos de fêmeas P_{MS} X machos S_1 (20 amostras) (Figura 24).

As fêmeas híbridas desse intercruzamento manifestaram as bandas 1 e 5 na região catódica, depois mostraram uma região com ausência de bandas até o início da região das bandas β -esterásicas, na qual seguiram o padrão do macho S_1 . Algumas das

Tabela 6. Cruzamentos, preparados em “massa”, entre linhagens de diferentes espécies, para análise do padrão de híbridos e sua produtividade (número de descendentes) em F_1 . F=fêmea; M=macho.

Cruzamentos		Produtividade em F_1	
F	M	F	M
P_{MS}	S_1	17	19
S_1	P_{MS}	16	18
S_1	P_5	8	6
P_5	S_1	6	6
P_4	Se	7	8
Se	P_4	4	2
P_{2a}	S_7	10	8
S_7	P_{2a}	0	0
P_4	S_7	10	6
S_7	P_4	0	0
Ch	P_4	8	10
P_4	Ch	6	8
P_{2a}	Se	16	19
Se	P_{2a}	0	0

Híbridos de fêmeas P_5 X machos S_1 (6 amostras) (Figura 26).

Os híbridos desta direção de cruzamento, na região catódica, também

Híbridos de fêmeas P_{MS} X machos S_1 (20 amostras) (**Figura 24**).

As fêmeas híbridas desse intercruzamento manifestaram as bandas 1 e 5 na região catódica, depois mostraram uma região com ausência de bandas até o início da região das bandas β -esterásicas, na qual seguiram o padrão do macho S_1 . Algumas das fêmeas híbridas apresentaram a banda 30 que é característica da linhagem P_{MS} . Os machos híbridos, aparentemente acompanharam, na região mais catódica, o padrão dos machos parentais, isto é, apresentaram as bandas 1 e 4. Na região intermediária, apresentaram todas as bandas presentes em ambos os pais, manifestando, inclusive, a banda 14, macho-específica. Na região das β -esterases intermediárias, porém, todos os machos híbridos seguiram o padrão das fêmeas parentais, exceto pela ausência da banda 30 que se localiza próxima do final da região das β -esterases, na linhagem P_{MS} .

Híbridos de fêmeas S_1 X machos P_{MS} (20 amostras) (**Figura 25**).

As observações feitas neste cruzamento recíproco são basicamente as mesmas do cruzamento anterior. As fêmeas híbridas, na região mais catódica, apresentaram aparentemente, as bandas 1 e 5 seguindo o padrão de P_{MS} , enquanto a região intermediária não apresentou bandas. Na região das β -esterases, os machos, seguiram o padrão de P_{MS} e as fêmeas, um ou outro dos padrões. Todos os machos híbridos apresentam a banda 14, macho-específica, oriunda da linhagem S_1 . A banda 30 que é característica de P_{MS} manifestou-se em alguns machos e algumas fêmeas híbridas.

Híbridos de fêmeas S_1 X machos P_5 (6 amostras) (**Figura 26**).

Os híbridos, fêmeas e machos, deste cruzamento, na região mais catódica, seguiram o padrão de *D. prosaltans* no que se refere à presença da banda 5. Todos apresentaram a banda β -esterásica 1, nessa mesma região. No que se refere às bandas da região das β -esterases, todos seguiram o padrão de *D. saltans*. A banda 14, macho específica de S_1 , aparece com uma atividade muito fraca em duas das três amostras analisadas. A banda 15, de P_5 , aparece em alguns dos híbridos.

Híbridos de fêmeas P_5 X machos S_1 (6 amostras) (**Figura 26**).

Os híbridos desta direção de cruzamento, na região catódica, também



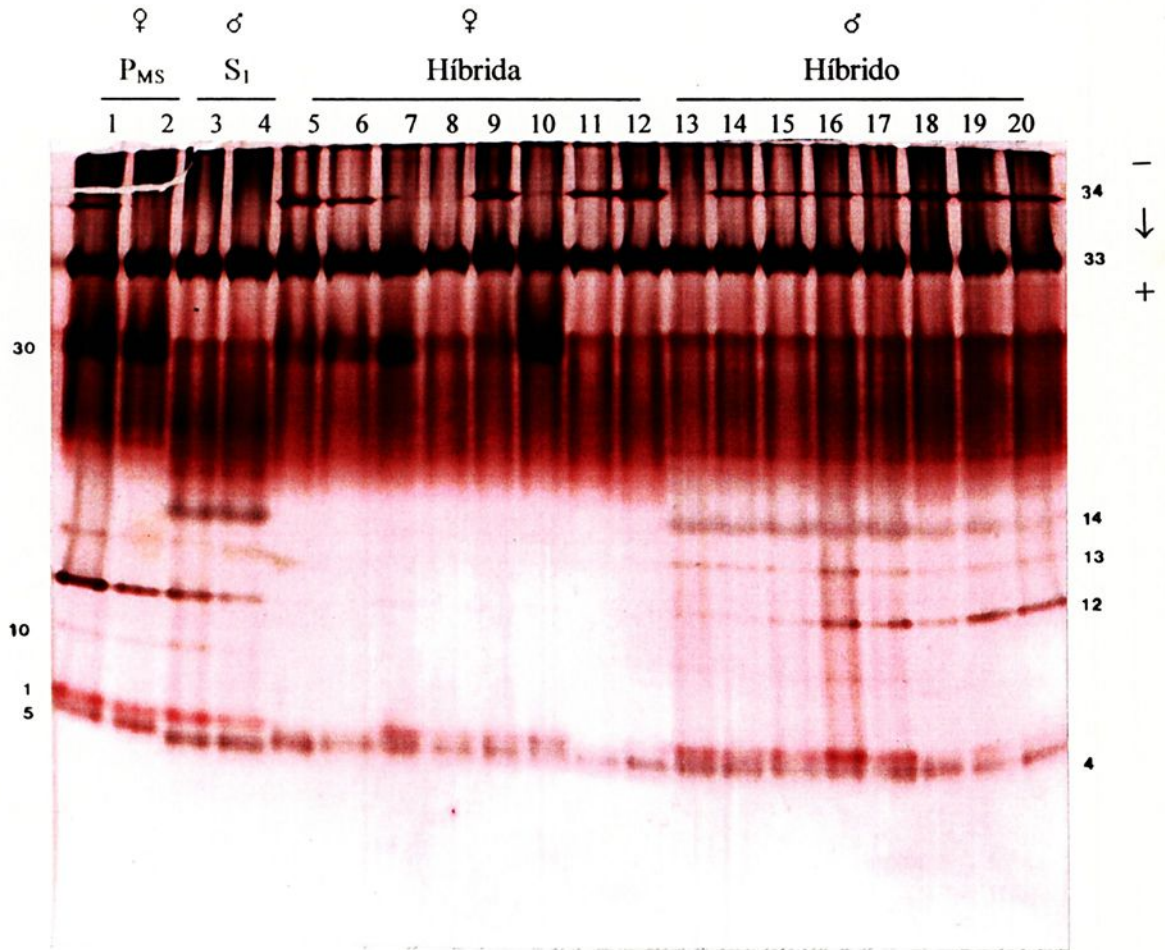


Figura 24. Padrão de esterases de indivíduos parentais e híbridos dos cruzamentos entre: fêmea P_{MS} x macho S_I .

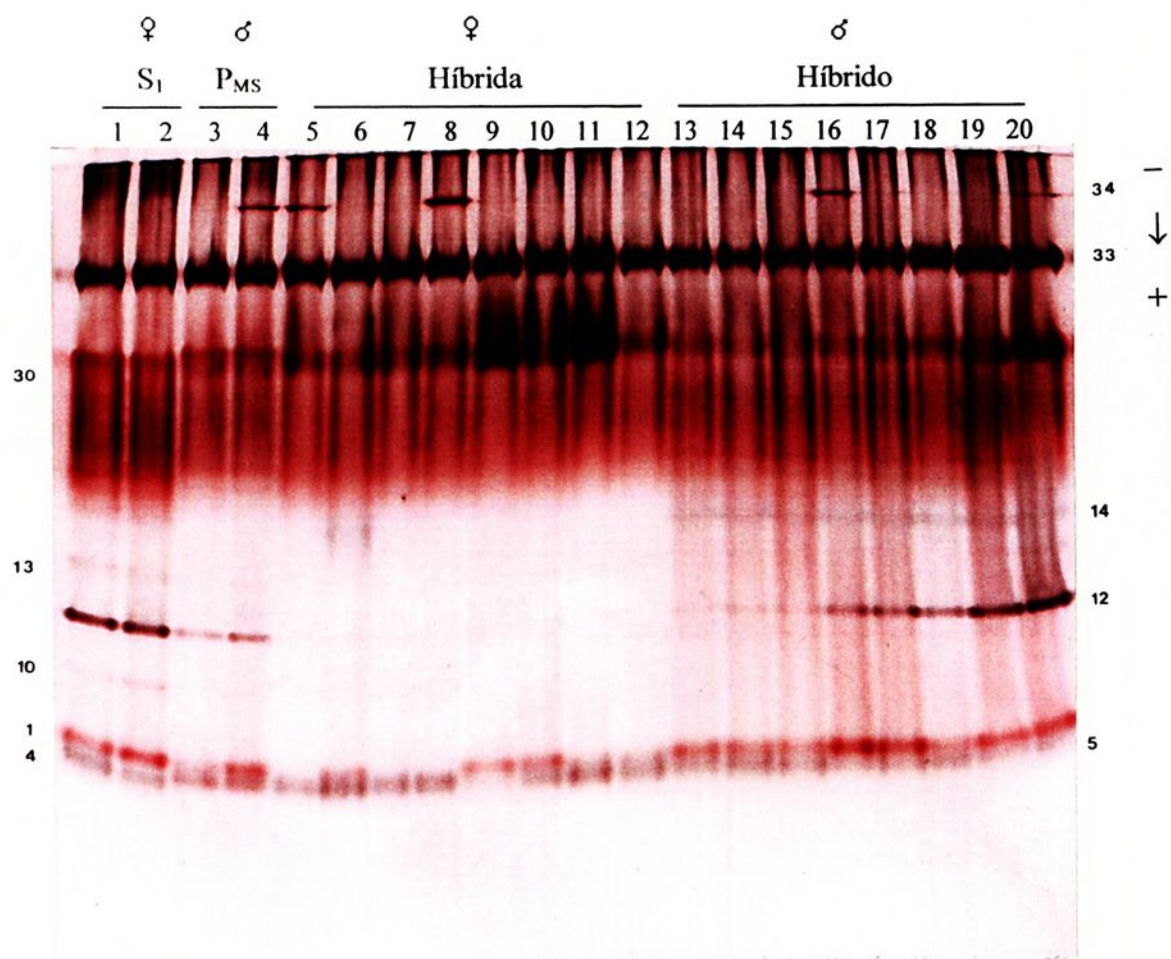


Figura 25. Padrão de esterases de indivíduos parentais e híbridos dos cruzamentos entre: fêmea S_1 x macho P_{MS} .

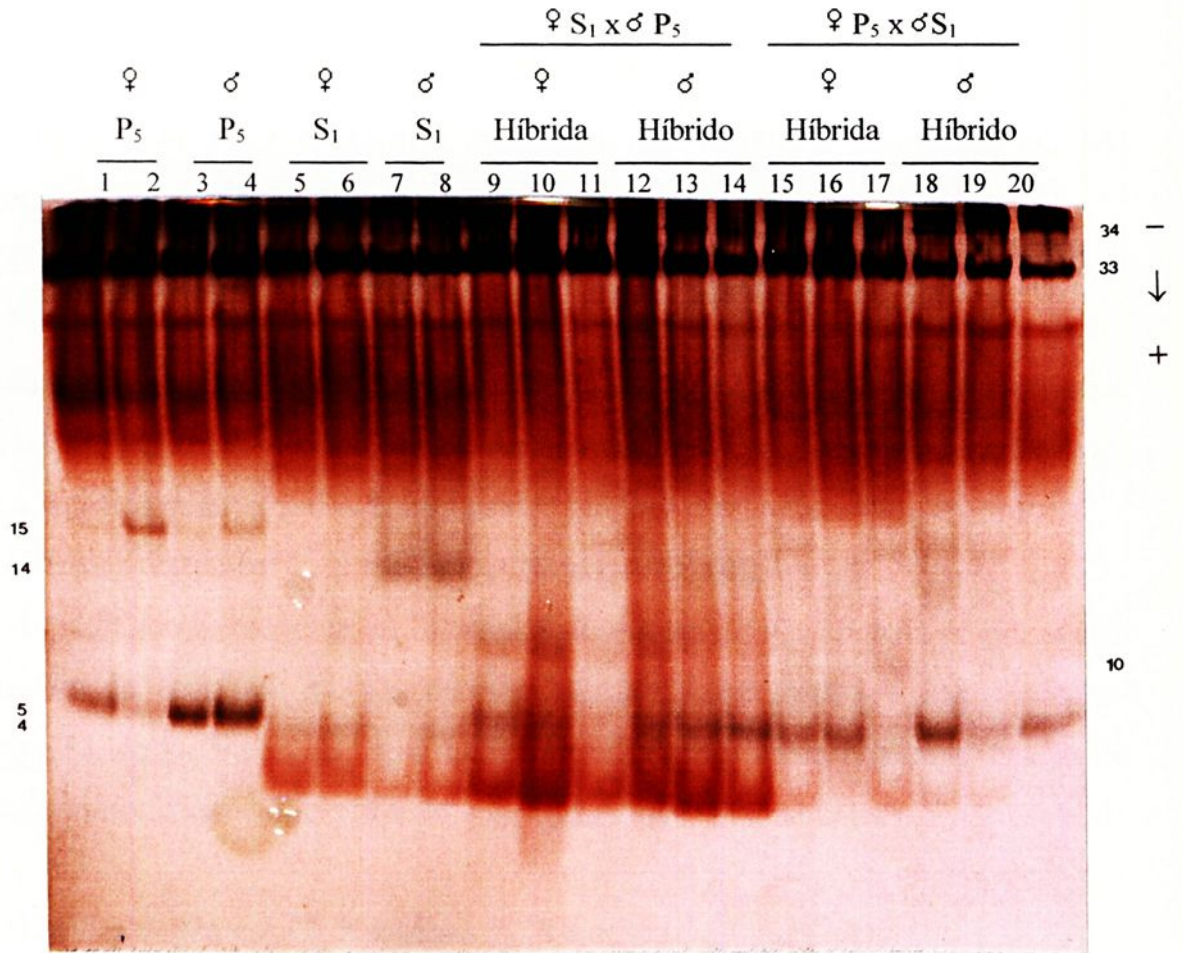


Figura 26. Padrão de esterases de indivíduos parentais e híbridos dos cruzamentos entre: fêmea S_1 x macho P_5 e fêmea P_5 x macho S_1 .

apresentaram a banda α -esterásica 5, de P_5 . Na região das β -esterases, as fêmeas seguem o padrão de *D. saltans* e os machos, o padrão de *D. prosaltans*. Observa-se quanto à banda 1, que os híbridos apresentam uma intensidade de coloração menor que no cruzamento recíproco. Quanto às demais características, são como as dos híbridos dos cruzamentos recíprocos, já descritos.

Híbridos de fêmeas P_4 X machos Se (7 amostras) (**Figura 27**).

Nesta direção de cruzamento, os géis mostram que, na região das bandas β -esterásicas, as fêmeas híbridas seguiram o padrão de *D. septentrionsaltans* e, os machos seguiram o padrão de *D. prosaltans*. Na região mais catódica, os machos híbridos apresentaram a banda β -esterase 1 e a α -esterase 5.

Híbridos de fêmeas Se X machos P_4 (3 amostras) (**Figura 27**).

Foram analisados poucos híbridos, devido à baixa produtividade destes cruzamentos. A respeito deles, pode-se dizer apenas que, quanto à região das bandas β -esterásicas, seguiram o padrão de *D. septentrionsaltans* e que, quanto à região mais catódica, apresentaram as mesmas bandas dos híbridos dos cruzamentos recíprocos.

Híbridos de fêmeas P_4 X machos S_7 (9 amostras) (**Figura 28**).

Na região mais catódica, os híbridos parecem apresentar a banda 6, que ocorre nos machos da linhagem S_7 . Os machos híbridos apresentaram a banda macho-específica 11, de S_7 . Na região das β -esterases, os híbridos apresentaram as bandas de S_7 , incluindo as de número 17, 22 e 26. Os machos apresentaram, ainda, a banda 16, de S_7 .

Híbridos de fêmeas Ch X machos P_4 (8 amostras) (**Figura 29**).

Na região mais catódica, as fêmeas parentais e as fêmeas híbridas apresentaram apenas a banda β -esterásica 1, enquanto os machos híbridos apresentaram também a banda α -esterásica 5, característica de P_4 . Neste caso, como aconteceu com a maioria das fêmeas híbridas de *D. prosaltans* e *D. saltans*, a área entre a região mais catódica e a região β -esterásica é, praticamente, vazia de bandas. Nela constatamos apenas as bandas 13 e 15. Na região das β -esterases, os híbridos seguiram o padrão de Ch apresentando, inclusive a banda 17.



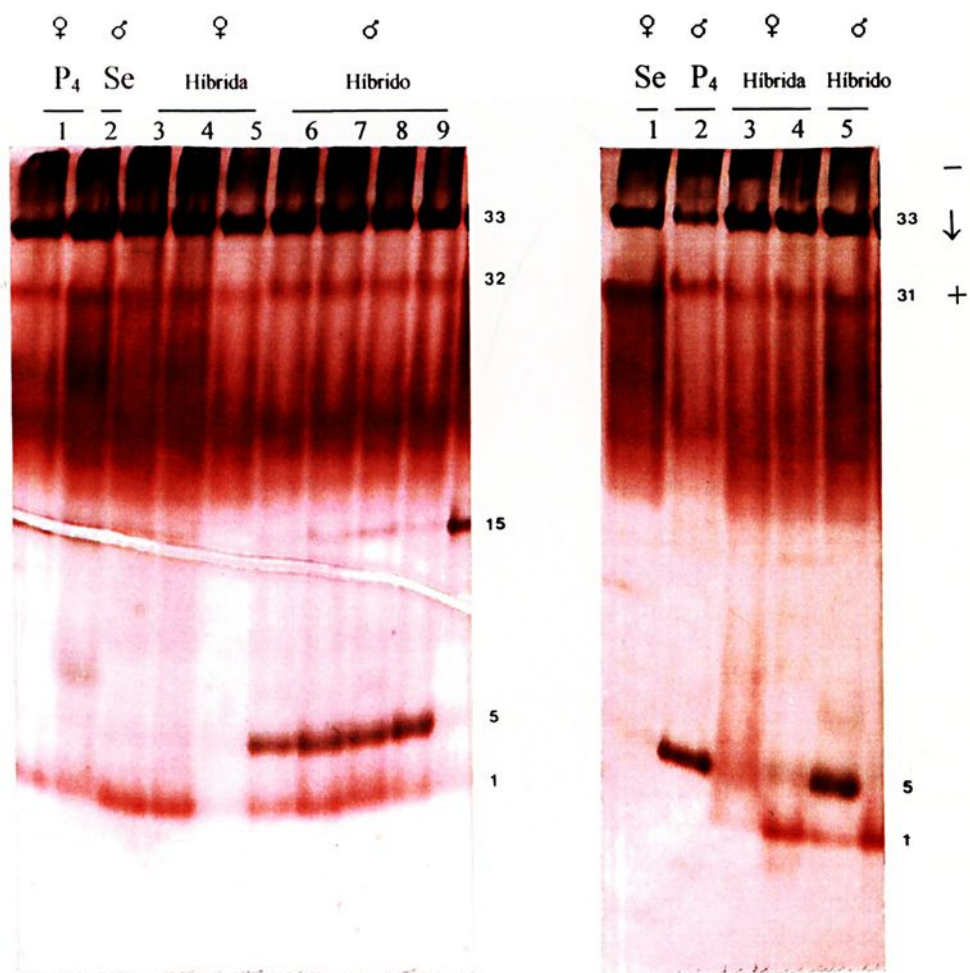


Figura 27. Padrão de esterases de indivíduos parentais e híbridos dos cruzamentos entre: fêmea P₄ x macho Se e fêmea Se x macho P₄.

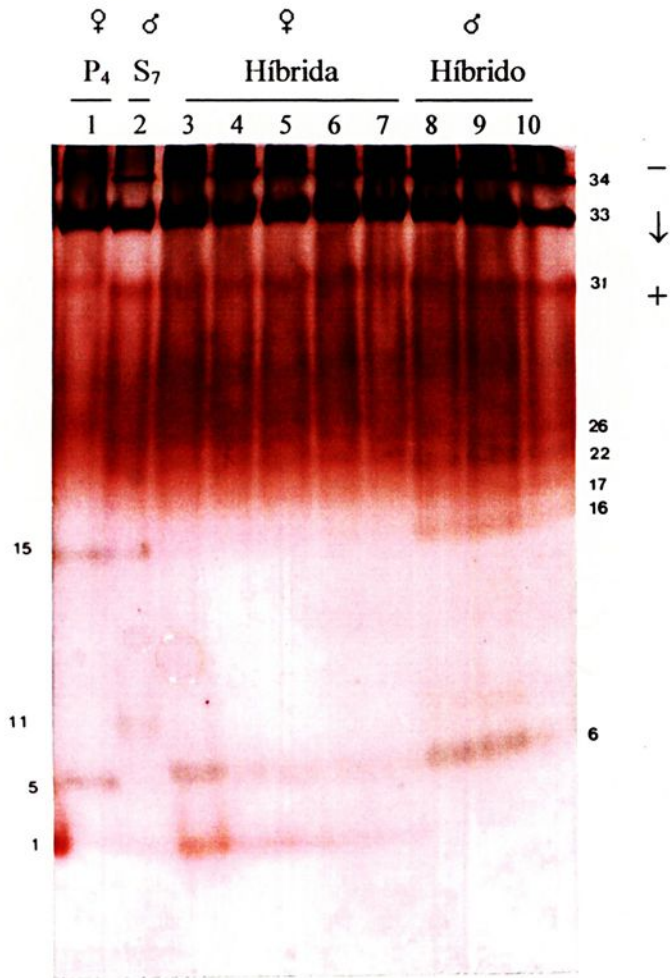


Figura 28. Padrão de esterases de indivíduos parentais e híbridos dos cruzamentos entre: fêmea P₄ x macho S₇.

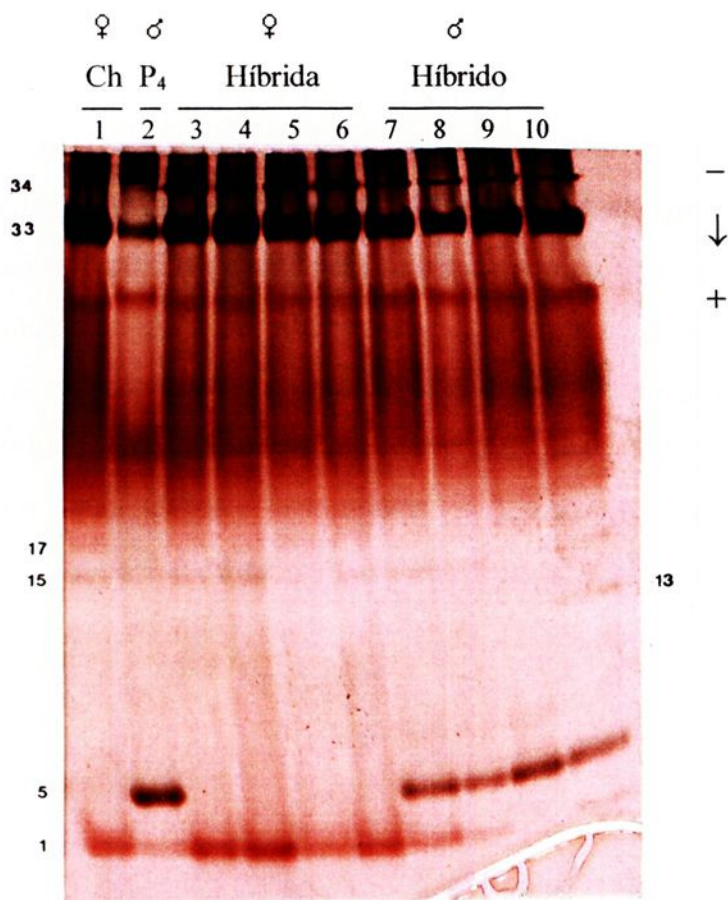


Figura 29. Padrão de esterases de indivíduos parentais e híbridos dos cruzamentos entre: fêmea Ch x macho P₄.

Híbridos de fêmeas P_{2a} X machos Se (16 amostras) (**Figura 30**).

Os híbridos fêmeas e machos, deste cruzamento, mostraram, predominantemente, o padrão de P_{2a} . Isto é válido, especialmente, para as bandas mais catódicas e para as bandas da região das β -esterases. Estes híbridos manifestaram as bandas 12, 13 e 15, na região intermediária.

5. Análise de Aglomerados (Cluster Analysis)

A **Figura 31** apresenta os agrupamentos das linhagens do subgrupo *saltans* e controle externo, analisadas com base nos padrões de esterases. No subgrupo *saltans*, a maior similaridade foi observada entre as linhagens de *D. prosaltans*; em seguida vêm as linhagens de *D. saltans* e a de *D. septentrionsaltans*. A linhagem de *D. austrosaltans* foi a que mostrou menor grau de similaridade com as demais do mesmo grupo. Considerando as espécies, *D. saltans* e *D. septentrionsaltans* são as mais próximas entre si. Segue-se a proximidade dessas espécies com *D. prosaltans*. *Drosophila austrosaltans* é a espécie mais distante das demais. A linhagem Canton S, como esperado, apresentou o mais baixo nível de similaridade com relação a todas as outras linhagens.

Figura 30. Padrão de esterases de indivíduos parentais e híbridos dos cruzamentos entre: fêmea P_{2a} x macho Se.

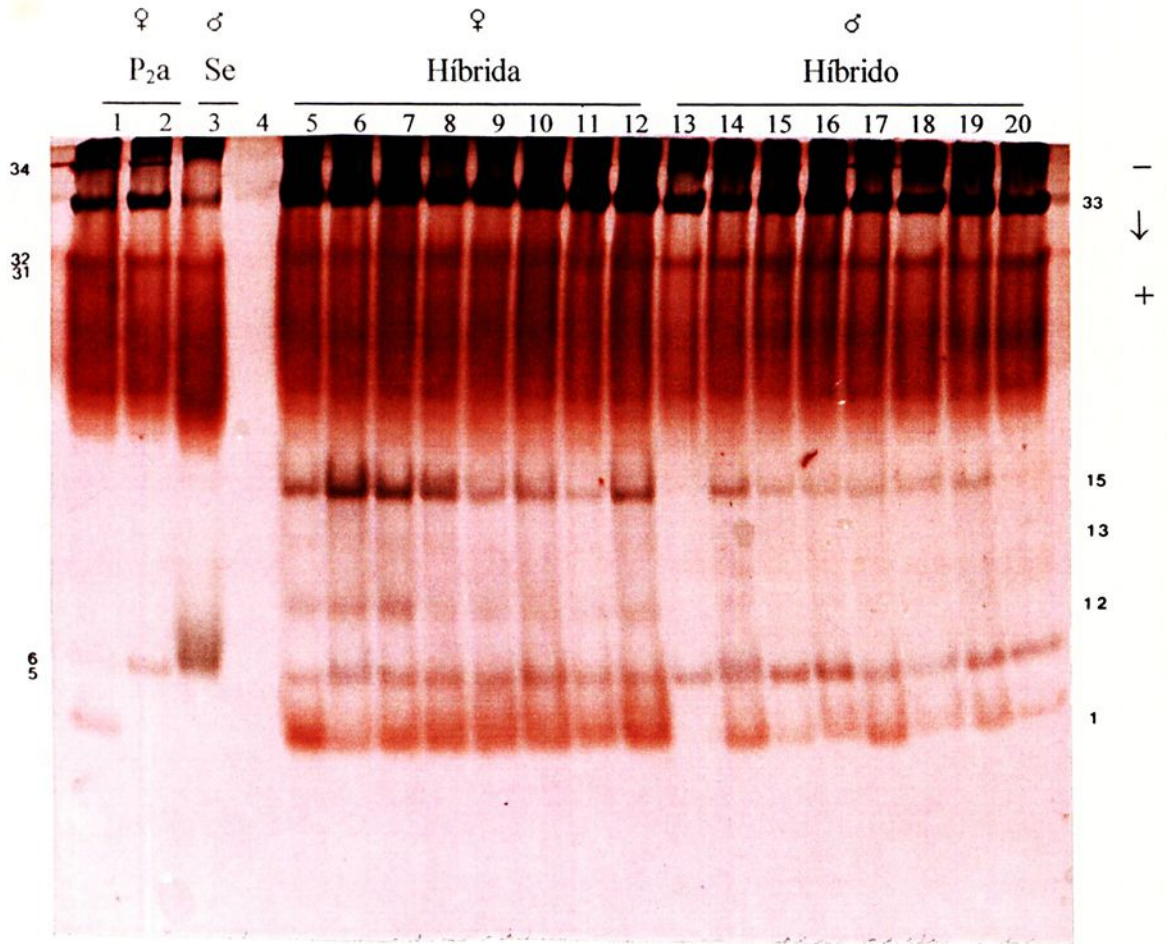


Figura 30. Padrão de esterases de indivíduos parentais e híbridos dos cruzamentos entre: fêmea P₂a x macho Se.

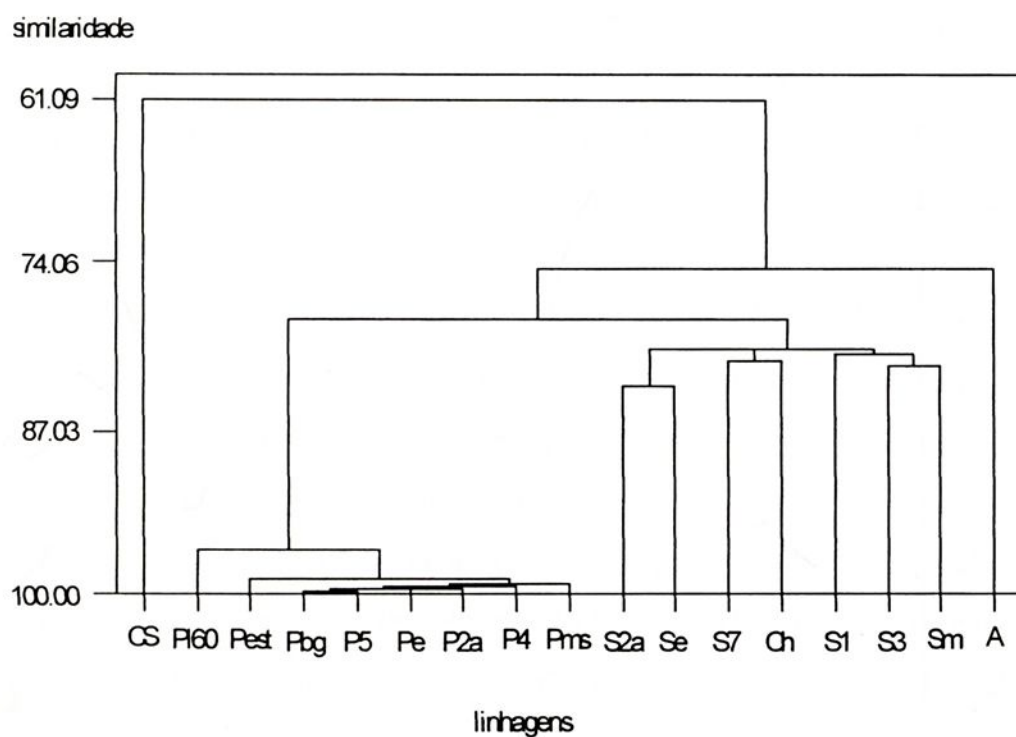


Figura 31. Análise de aglomerados mostrando a similaridade das linhagens analisadas com base nos padrões de esterases.

IV-DISCUSSÃO

Apesar de todo o tempo decorrido desde que Darwin apresentou suas idéias sobre o papel da seleção natural na evolução, ainda permanecem em discussão muitos aspectos tais como os relativos a como a variabilidade genética é trabalhada na determinação do valor adaptativo dos organismos ou como se estabelecem os mecanismos de isolamento na especiação. Os pesquisadores têm procurado estudar grupos de espécies próximas quanto a diferentes parâmetros numa tentativa de esclarecer, pelos dados obtidos, alguns aspectos desses problemas.

O grupo *saltans*, de ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, tem se mostrado extremamente interessante para estudos de especiação. Características tais como morfologia do edeago (Magalhães, 1962; Magalhães & Bjornberg, 1957), análise bioquímica das pteridinas (Throckmorton & Magalhães, 1962), isolamento reprodutivo (Bicudo, 1973 a; 1978), polimorfismo devido a inversões (Bicudo, 1973 b) e análise de sequências de DNA nuclear e mitocondrial (O'Grady *et al.*, 1998) têm contribuído para um conhecimento acumulado dessas espécies.

O presente trabalho acrescenta ao conjunto de dados existentes, informações relativas aos padrões de esterases de 16 linhagens de quatro espécies, assim distribuídas:- 8 de *D. prosaltans*, 6 de *D. saltans*, 1 de *D. austrosaltans* e 1 de *D. septentriosaltans*. O padrão das linhagens coletadas mais recentemente, de *D. prosaltans* e *D. saltans*, e o padrão das linhagens mantidas longamente em laboratório aparentemente não diferiram.

Foram observadas 34 bandas esterásicas, classificadas com base na afinidade pelo α e β -naftil acetato, em 18 α -esterases, 15 β -esterases e 1 α/β -esterase.

Todas as bandas β -esterásicas foram inibidas pelo malathion, sugerindo tratar-se de carboxilesterases. Entre as bandas α -esterásicas, a de maior destaque pela espessura e intensidade de coloração e presença em todas as linhagens e indivíduos analisados foi a banda 33, inibida pelo malathion e pelo sulfato de eserina, o que indica sua classificação bioquímica como colinesterase. Nenhuma banda foi afetada pelo pCMB, nas condições utilizadas.



A presença constante da banda 33, em todas as linhagens, espécies, indivíduos e fases do desenvolvimento analisados, e sua classificação como colinesterase podem sugerir que se trata de acetilcolinesterase. Nos insetos, a deficiência dessa enzima é letal no estado embrionário e sua inibição causa a morte como mencionamos anteriormente. A linhagem usada como controle externo Canton S, de *D. melanogaster*, espécie esta que da mesma forma que as do grupo *saltans* inclui-se no subgênero *Sophophora*, também mostrou o que parece ser a mesma banda, em todos os indivíduos analisados, reforçando a idéia da importância da esterase correspondente a ela.

É importante destacar alguns aspectos dos padrões observados. Um deles refere-se a três bandas α -esterásicas (bandas 11, 14 e 18) encontradas apenas em machos de *D. saltans* e de *D. septentrionsaltans*. As três foram observadas na primeira espécie e duas, na segunda espécie (bandas 11 e 18). A banda 11 é a de mais ampla distribuição, tendo sido encontrada em cinco linhagens de *D. saltans*, com frequências variáveis de 18% a 100% e em *D. septentrionsaltans* com 100% de frequência. A banda 14 foi observada em apenas duas linhagens de *D. saltans*, ocorrendo com 100% de frequência, em uma, e 22%, em outra. A banda 18 foi encontrada em três linhagens de *D. saltans* com frequências que variaram de 7,5% a 100% e 1,2% em *D. septentrionsaltans*. Embora, em algumas linhagens, a frequência dessas bandas seja relativamente baixa, considerando o número de indivíduos analisados e o fato de que, em outras linhagens, elas ocorreram com 100% de frequência, achamos que podemos considerá-las macho-específicas, com boa margem de segurança. Nenhuma dessas bandas macho-específicas foi inibida pelo malathion e apenas a banda 11 foi testada com o sulfato de eserina, que também não a afetou.

* Bandas macho-específicas foram anteriormente detectadas, em outros trabalhos. Ceron (1988) detectou uma α -esterase específica dos machos de *D. mulleri* e duas bandas, uma β e uma α -esterase, exclusivas dos machos de *D. arizonae*. Lapenta *et al*, (1995, 1998), estudando o padrão de esterases do cluster *D. buzzatii*, encontraram 7 bandas específicas de machos, sendo 5 α -esterásicas e 2 β -esterásicas.



Outro aspecto a ser destacado é o que se refere à variação do grau de atividade de algumas bandas esterásicas, em fêmeas e machos. Talvez possamos considerar este caso como uma variação do caso anterior em que as bandas não se manifestam em um sexo. Entre as bandas observadas, citamos as α -esterásicas 5, 6, 7 e a β -esterásica 1. A observação dos géis e especialmente dos gráficos de perfil, mostra que em alguns casos, a diferença de atividade é bastante acentuada, tendo as bandas de menor atividade, valores que se aproximam da cor branca. As bandas 5 e 7 apresentam-se mais intensamente coradas nos machos que nas fêmeas, enquanto o oposto ocorre com as bandas 1 e 6. Deve-se observar que a variação da intensidade de coloração ocorreu também entre linhagens diferentes; é o caso da banda 6 nas linhagens Ch de *D. saltans* e Se de *D. septentriosaltans*. Mesmo entre indivíduos de mesma espécie e mesma linhagem, uma mesma banda pode apresentar alguma variação.

A variação entre indivíduos, da intensidade de coloração, pode ser fruto da ação de diferenças no background genético, tendo em vista que se procurou preparar todas as amostras da mesma forma. Quanto à variação no grau de atividade, incluindo as bandas macho-específicas, ou no caso de variação interlinhagem, deve ser fruto da atuação de mecanismos reguladores da expressão gênica, adequando a quantidade do produto às necessidades diferenciais.

Outro aspecto refere-se ao padrão das esterases no desenvolvimento. O estudo da expressão gênica no desenvolvimento é importante porque pode levar ao conhecimento dos mecanismos pelos quais os genes são temporalmente regulados. Devido ao estudo de um pequeno número de indivíduos ao longo do desenvolvimento, não podemos utilizar os padrões observados para uma discussão ampla quanto às diferenças entre linhagens e espécies. Podemos utilizá-los, porém, para a detecção de esterases que não ocorrem nos adultos, que neste trabalho foram submetidos a uma análise muito mais abrangente. Assim, foram observadas, em larvas, pupas e casulos vazios das pupas, 7 bandas que parecem não fazer parte do padrão dos adultos. Duas dessas bandas foram observadas em larvas, pupas e casulos vazios de pupas, uma foi observada em larvas e casulos, uma em pupas e três, apenas em casulos.

Alguns trabalhos, na literatura, relatam a ocorrência de esterases específicas de fases anteriores à adulta. Em *Drosophila mulleri* e *D. arizonae* (anteriormente, *D. arizonensis*) foi observada uma esterase em larvas e pupas (esterase L) e três em pupas (esterases P_a, P_b e P_c) (Ceron, 1988). Os resultados observados para essas duas espécies foram posteriormente estendidos para outras do complexo *mulleri* (Mateus, 1997). Todas apresentaram uma esterase exclusiva de larvas do 3º estágio e pupas. A caracterização bioquímica dessa banda, pelo uso do PMSF, indicou tratar-se de uma serina-esterase, possivelmente uma acetilesterase, que poderia estar envolvida no metabolismo do hormônio juvenil, segundo o autor. Entre outros trabalhos, em *Drosophila*, que mencionam esterases específicas de fases anteriores à adulta, citamos ainda, Berger & Canter, 1973; Korochkin & Mtveera, 1974; Rauschenbach, *et al.*, 1977; Morton & Singh, 1980; Zouros *et al.*, 1982; East, 1982; Ceron, 1988 e Mateus *et al.*, 1996.

Uma diferença entre as esterases restritas às fases precoces do desenvolvimento encontradas no presente trabalho e as detectadas por Ceron (1988) e Mateus (1997), é que as bandas por eles observadas são β -esterases que poderiam corresponder, segundo esses autores, à EST-4 e EST-5 observadas por Zouros *et al.*, 1982, em *D. mojavenensis*, enquanto nas espécies do subgrupo *saltans* são todas α -esterases.

A presença de banda em uma determinada fase do desenvolvimento é indicativa da atuação de mecanismos reguladores que permitem que o gene correspondente se expresse, nessa fase, para desempenhar um papel específico. No caso dos insetos holometábolos, em que a passagem de um estágio para outro é regulada por mecanismos hormonais, podemos supor uma relação entre esterases estágio-específicas e metamorfose. Como mencionamos anteriormente, a literatura registra associações propostas por vários autores, entre esterases e níveis de hormônio juvenil. Segundo Gu e Zera (1993), a esterase do hormônio juvenil (JHE) é uma carboxilesterase que degrada o hormônio juvenil o qual, por sua vez, é importante do ponto de vista gonadotrófico e do desenvolvimento. Esta enzima atua na regulação da metamorfose. Em *Gryllus assimilis* esses autores observaram perfis do JHE e de esterases, no desenvolvimento, altamente concordantes.

No presente trabalho, algumas bandas características dos adultos também foram encontradas nos casulos, destacando-se, neste caso, as bandas 33 e 34.

O primeiro trabalho que demonstrou a ocorrência de esterases nos casulos foi realizado por Berger & Canter (1973), em *D. pseudoobscura*. Segundo esses autores, essas enzimas se posicionavam na região anódica dos géis e se apresentavam com atividade máxima nas larvas. Ceron (1988) observou que uma esterase detectada na fase de pupa, também ocorria nos casulos de *D. mulleri* e *D. arizonae*. Em casulos de *Megaselia scalaris*, como já mencionado, Ritz (1997) detectou três bandas. Segundo Berger & Canter (1973, in Ritz, 1997) as enzimas esterásicas detectadas nos casulos vazios, e que esses autores também encontraram nas pupas, poderiam estar relacionadas com o processo de muda, realizando a digestão da cutícula das mesmas. No presente trabalho, não encontramos bandas ocorrendo em pupas e casulos apenas.

Híbridos foram analisados no presente trabalho, apenas nos cruzamentos entre linhagens de *D. prosaltans* com *D. saltans* e de linhagens de *D. prosaltans* com *D. septentriosaltans*. Entre as espécies analisadas, essas são as únicas combinações que produzem híbridos, de acordo com o trabalho de Bicudo (1973 a).

Uma observação, com relação ao padrão de bandas dos híbridos, é que, nas fêmeas, há geralmente ausência de bandas na região localizada entre a região catódica e a região das β -esterases, característica do padrão do parental *D. prosaltans*. Isto parece indicar que as fêmeas híbridas seguem preferencialmente o padrão das linhagens de *D. prosaltans* mesmo quando os cruzamentos parentais envolvem os machos e não as fêmeas dessas linhagens. Os machos híbridos, porém, geralmente, apresentam as bandas parentais presentes nas linhagens de *D. saltans* ou de *D. septentriosaltans*, conforme o cruzamento, nessa mesma região. Destaca-se nos machos híbridos de fêmeas S_1 X machos P_5 ou machos P_{MS} a presença da banda macho-específica 14, a qual se manifesta mesmo quando a fêmea parental é que transporta o gene responsável pela banda. Isto significa que nas fêmeas parentais, esse gene sofre repressão, e ao ser passado à descendência do sexo masculino, sofre desrepressão, mesmo sendo híbridos. Porém não são todos os machos híbridos que apresentam a banda 14, que ocorre em 100% dos machos parentais, da linhagem S_1 , o

que significa que a desrepressão não é geral, nessas condições. No caso do cruzamento entre fêmeas P_{2a} e machos Se, porém, embora a linhagem Se tenha apresentado a banda macho-específica 11 em 100% dos indivíduos, nos machos híbridos esta banda não foi visualizada. Talvez a condição híbrida, no caso, não permita sua expressão.

Por outro lado, no cruzamento de fêmeas Ch e machos P₄, a banda macho-específica 11, presente na linhagem Ch, foi observada nos machos híbridos com atividade baixa (as bandas eram muito claras). De modo geral, todos os machos híbridos apresentam as bandas macho-específicas com atividade mais fraca que nas linhagens parentais.

Pode-se supor que existam efeitos deletérios causados pela ausência da banda macho-específica, para esses organismos. Outras análises abrangendo estudos das bandas e de parâmetros como capacidade reprodutiva, viabilidade e velocidade de desenvolvimento deverão ser realizadas em continuação a este trabalho, na tentativa de ampliar informações a esse respeito. Em geral, os machos híbridos apresentam maiores problemas biológicos que as fêmeas híbridas e isto poderia envolver também aspectos da regulação das esterases no desenvolvimento.

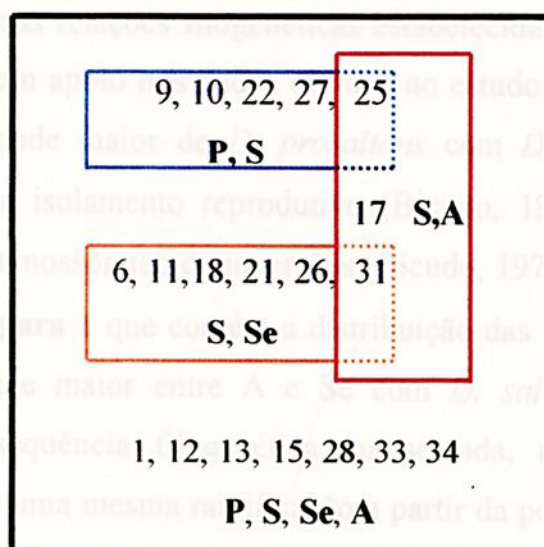
A singularidade das espécies do subgrupo *saltans* que se tem verificado ao analisar diferentes parâmetros, não impede que se possa estabelecer, tentativamente, a proximidade entre elas, com base nas características comuns.

Das 34 bandas esterásicas, detectadas no presente trabalho, sete ocorreram nas quatro espécies, cinco foram comuns a *D. saltans* e *D. septentriosaltans*, quatro foram comuns a *D. prosaltans* e *D. saltans*, uma foi comum a *D. saltans*, *D. septentriosaltans* e *D. austrosaltans*, uma foi comum a *D. saltans*, e *D. austrosaltans*, e, finalmente uma, foi comum a *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. austrosaltans*. Observa-se assim, que a diferenciação das espécies não impediu a manutenção de várias bandas comuns.

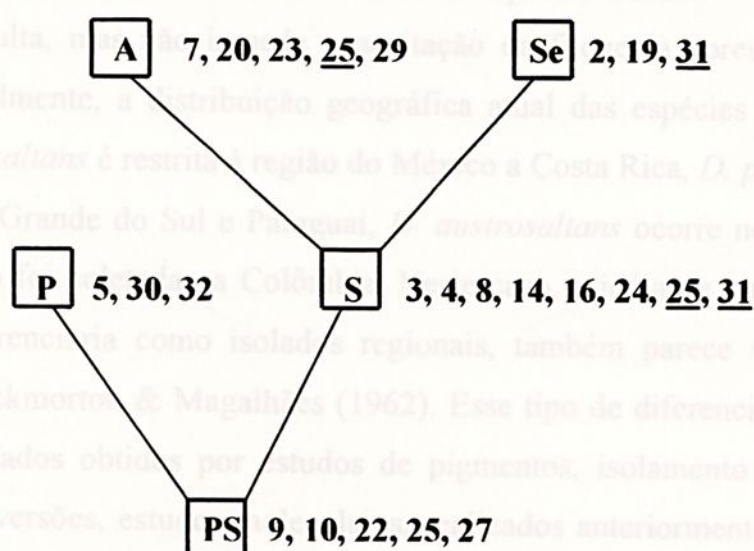
O padrão de partilhamento dessas bandas foi usado para traçar o diagrama apresentado a seguir, o qual mostra a interrelação das espécies, com base nos mesmos.

O retângulo maior contém as bandas partilhadas pelas quatro espécies e os retângulos menores, as bandas comuns a duas ou três espécies. A banda 31 interliga o retângulo de S, Se e o retângulo de S, A, enquanto a banda 25 interliga o retângulo de

P, S e o retângulo de S,A. Assim, através dessas bandas todas as espécies se interligam.



Ainda, com base nesses resultados, podemos supor a derivação das espécies conforme o esquema a seguir, no qual estão incluídas as bandas partilhadas (grifadas) e também as bandas exclusivas de cada espécie.



Nessa tentativa de filogenia, propõe-se uma população básica composta pelas bandas esterásicas partilhadas por *D. prosaltans* e *D. saltans* da qual teriam se derivado, de um lado *D. saltans* e de outro *D. prosaltans*. *Drosophila saltans* ter-se-ia diferenciado originando *D. septentriosaltans* e *D. austrosaltans*.

A comparação dessas relações filogenéticas estabelecidas com base nos dados de esterases encontra algum apoio nos dados obtidos no estudo de outros parâmetros. Por exemplo, a proximidade maior de *D. prosaltans* com *D. saltans* foi também observada nos estudos de isolamento reprodutivo (Bicudo, 1973 a) e também nos dados de polimorfismo cromossômico de inversões (Bicudo, 1973 b). Por outro lado, a simples observação da **Figura 1** que contém a distribuição das 34 bandas esterásicas, já indica uma proximidade maior entre A e Se com *D. saltans* do que com *D. prosaltans*. Assim, na sequência filogenética apresentada, as três espécies são consideradas derivadas de uma mesma ramificação a partir da população PS básica. A análise de aglomerados utilizando as bandas partilhadas e exclusivas, com as frequências, em todas as linhagens, confirma a associação estabelecida pelo partilhamento de bandas.

Throckmorton & Magalhães (1962) concluíram, como foi mencionado na Introdução, que *D. prosaltans*, pelo fato de apresentar maior variabilidade quanto ao acúmulo de pteridinas, talvez pudesse ser considerada a própria população tronco. Os dados do presente trabalho também não descartam essa possibilidade.

O que dificulta, mas não impede a aceitação da filogenia apresentada nesse trabalho é principalmente, a distribuição geográfica atual das espécies do subgrupo *saltans*, porque *D. saltans* é restrita à região do México a Costa Rica, *D. prosaltans*, de Costa Rica ao Rio Grande do Sul e Paraguai, *D. austrosaltans* ocorre no Brasil e *D. septentriosaltans* só foi coletada na Colômbia. Neste caso, a idéia de uma população tronco que se diferenciaria como isolados regionais, também parece válida, como mencionaram Throckmorton & Magalhães (1962). Esse tipo de diferenciação poderia compatibilizar os dados obtidos por estudos de pigmentos, isolamento reprodutivo, polimorfismo de inversões, estudos moleculares, realizados anteriormente e os dados do presente trabalho quanto ao padrão de esterases.

V-Re O trabalho de O'Grady *et al.* (1998), envolvendo o estudo do gene da citocromo oxidase I mitocondrial, apresenta uma diferenciação acentuada entre populações de *D. prosaltans*. Entretanto, esses resultados podem ser decorrentes da diferenciação geográfica constatada por isolamento reprodutivo incipiente entre populações dessa espécie (Bicudo, 1978). Essa diferenciação incipiente poderia manifestar-se em algumas características e não em outras.

De qualquer modo, os resultados obtidos com a análise dos padrões das esterases revelaram mais uma vez, que os mesmos constituem um bom parâmetro para verificar diferenças entre espécies próximas e assim poderão contribuir significativamente para o estudo do processo de especiação. Será interessante dar continuidade a esses estudos.

- 1- A presença de 34 bandas esterásicas, classificadas, com base na sua afinidade pelos substratos α e β -naftil acetato, em 18 α -esterases, 15 β -esterases e 1 α/β -esterase. Uma das bandas ocorreu em todos os indivíduos de todas as linhagens analisadas e as demais bandas mostraram variação quanto à presença nas linhagens e espécies. Bandas altamente frequentes geralmente referem-se a genes de atividades essenciais.
- 2- Três das 18 α -esterases, as bandas 11, 14 e 18, foram detectadas exclusivamente em machos, tendo sido consideradas macho-específicas. Essas bandas ocorreram nas espécies *D. saltans* (11, 14 e 18) e *D. septentrionalis* (11 e 18).
- 3- Variação quanto à espessura e intensidade de coloração das bandas, indicativa de atividade diferencial das enzimas a que elas correspondem, foram observadas entre indivíduos de mesma linhagem e mesmo sexo, entre os sexos na mesma linhagem, entre linhagens na mesma espécie e entre espécies.

Os dados referentes aos itens 2 e 3 podem ser indicativos da ocorrência de mecanismos de regulação operando para adequar a quantidade dos produtos gênicos às necessidades diferenciais dos organismos.

- 4- A inibição das bandas β -esterásicas, das α -esterases da região catódica e da banda 33, pelo uso do malathion; e a inibição da banda 33 pelo uso do sulfato de esterina.

V-Resumo e Conclusões

No presente trabalho foram analisadas 16 linhagens do subgrupo *saltans*, sendo 8 de *D. prosaltans*, 6 de *D. saltans*, 1 de *D. austrosaltans* e uma de *D. septentrionsaltans*.

Foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para a análise dos padrões de esterases, em adultos fêmeas e machos, com 10 dias de idade. Para verificar possíveis alterações do padrão de bandas, no desenvolvimento, também foram analisadas larvas, pupas e casulos vazios de pupas. Foram também realizados intercruzamentos para análise do padrão de esterases nos híbridos.

Foi observado o seguinte:

- 1- A presença de 34 bandas esterásicas, classificadas, com base na sua afinidade pelos substratos α e β -naftil acetato, em 18 α -esterases, 15 β -esterases e 1 α/β -esterase. Uma das bandas ocorreu em todos os indivíduos de todas as linhagens analisadas e as demais bandas mostraram variação quanto à presença nas linhagens e espécies. Bandas altamente freqüentes geralmente referem-se a genes de atividades essenciais.
- 2- Três das 18 α -esterases, as bandas 11, 14 e 18, foram detectadas exclusivamente em machos, tendo sido consideradas macho-específicas. Essas bandas ocorreram nas espécies *D. saltans* (11, 14 e 18) e *D. septentrionsaltans* (11 e 18).
- 3- Variação quanto à espessura e intensidade de coloração das bandas, indicativa de atividade diferencial das enzimas a que elas correspondem, foram observadas entre indivíduos de mesma linhagem e mesmo sexo, entre os sexos na mesma linhagem, entre linhagens na mesma espécie e entre espécies.

Os dados referentes aos itens 2 e 3 podem ser indicativos da ocorrência de mecanismos de regulação operando para adequar a quantidade dos produtos gênicos às necessidades diferenciais dos organismos.

- 4- A inibição das bandas β -esterásicas, das α -esterases da região catódica e da banda 33, pelo uso do malathion; e a inibição da banda 33 pelo uso do sulfato de eserina.



- Os dados sugerem que a banda 33 é uma colinesterase e as demais bandas inibidas pelo malathion, carboxilesterases.
- 5- O padrão no desenvolvimento mostrou 7 bandas esterásicas, não detectadas nos adultos, distribuídas entre larvas, pupas e casulos vazios das pupas, sendo duas bandas comuns a larvas, pupas e casulos, uma exclusiva de pupas, uma de larva e casulo e três apenas de casulos. As esterases específicas das fases de larva e pupa têm sido relacionadas com o metabolismo do hormônio juvenil e conseqüentemente, com a metamorfose. As detectadas nos casulos podem estar relacionadas com a digestão da cutícula para emergência do imago.
 - 6- O padrão de esterases nos híbridos mostrou ser constituído pela soma das bandas dos parentais ou seguir preferencialmente o padrão de um ou de outro dos mesmos.
 - 7- Uma tentativa de relação filogenética foi estabelecida com base no partilhamento das bandas esterásicas e na análise de aglomerados. Os dados de partilhamento das bandas foram indicativos de interrelação das quatro espécies, com maior proximidade entre *D. prosaltans* e *D. saltans* e uma maior proximidade desta última espécie em relação a *D. septentriosaltans* e *D. austrosaltans*. Os resultados produzidos pela análise de aglomerados foi basicamente semelhante.

Assim, os dados do presente trabalho permitiram caracterizar o padrão de esterases das linhagens e espécies do subgrupo *saltans* analisadas, estudar, por mais esse parâmetro, a proximidade filogenética entre elas, e abriram caminho para uma análise mais detalhada de alguns aspectos desse padrão, que podem ser promissores.

VI-Summary and Conclusions

Sixteen strains belonging to four species from the *saltans* subgroup were analyzed as to their esterase patterns using the technique of electrophoresis in polyacrylamide gels. The obtained data showed the following:

- 1- The presence of 34 esterase bands that were classified by using α naphthyl acetate and β -naphthyl acetate as substrates in 18 α -esterases, 15 β -esterases and 1 $\alpha\beta$ -esterase. One of those bands was found in every analyzed sample from every strain and species but the presence of the remaining bands varied among strains and species.
- 2- Three of the 18 α -esterases (bands 11, 14 and 18) were detected exclusively in males, in the species *D. saltans* (the three bands) and *D. septentriosaltans* (bands 11 and 18).
- 3- Differences on band thickness and staining degree that are indicative of different activity levels were observed among individuals from the same sex and strain, among sexes in the same strain, among strains of the same species and among species. Data in items 2 and 3 are indicative that gene regulation mechanisms are operating to adequate the amount of genic products to the organism special requirements.
- 4- All β -esterases, the less negative charged α -esterases and the α -esterase 33 were inhibited when gels were treated with malathion. The band 33 was also inhibited by eserine sulfate. These data indicated that the band 33 is a cholinesterase and the others are carboxylesterases.
- 5- The esterase patterns in development showed 7 bands not found in adults but present among larvae, pupae and pupal empty cases. Three of them occurred only in empty cases, 2 were common to larvae, pupae and adults, one was detected only in pupae and one in both larvae and empty cases. Esterases detected exclusively in developmental early phases have been considered involved in juvenil hormone

- metabolism and therefore in metamorphosis. Esterases detected in pupal cases have been related to cuticle digestion for emergence of pupae.
- 6- Esterases patterns in hybrids included bands from both parental strains or mainly bands from one or another of them.
 - 7- Phylogenetic relationships were tentatively established on the basis of band pattern sharing and cluster analysis. Bands shared by species indicated that the four species are related, but *D. prosaltans* is closer to *D. saltans*, and *D. septentrionsaltans* and *D. austrosaltans* are closer to *D. saltans* than to *D. prosaltans*. Cluster analysis reinforced these observations.

The data in the present work characterized the esterase patterns of the analyzed strains and species in the *saltans* subgroup, let to study, the phylogenetic relationships among them using another parameter and opened the opportunity of a deeper analysis of some aspects of the mentioned patterns that seem promising.

- S., RICHMOND, R., DOBZHANSKY, T. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. I. Genetic differentiation among sibling species. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, v. 67, n. 1, p. 225-232, 1970.
- AYALA, F. J., POWELL, J. R., TRACEY, M. L., MOURÃO, S. A., PEREZ-SALAS, S., RICHMOND, R., DOBZHANSKY, T. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genetic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, v. 70, p. 113-139, 1972.
- BAND, H. T. A survey of isozyme polymorphism in a *Drosophila melanogaster* natural population. *Genetics*, v. 30, p. 761-771, 1973.
- BARKER, S. F. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase-2 in two populations of *Drosophila buzzatii*. *Genetica*, v. 92, p. 163-175, 1994.
- BECKMAN, L., JOHNSON, F. M. Esterase variation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, v. 51, p. 212-220, 1964.
- BERGER, E. M. A temporal survey of allelic variation in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 67, p. 121-136, 1971.
- BERGER, E. M., CANTER, R. The esterase of *Drosophila*. I. The anodal esterases and their possible role in eclosion. *Develop. Biol.*, v. 33, p. 48-55, 1973.

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRIDGE, 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.
- ALEXSON, S., E. H., FINLAY, H. T., HELMAN, U., SVENSSON, L. T., DICZFALUSY, U., EGGERTSEN, G. Molecular cloning and identification of a rat serum carboxylesterase expressed in the liver. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 25, p. 17118-17124, 1994.
- 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, n. 5, p. 621-630, 1995.
- AYALA, F. J., MOURÃO, C. A., PEREZ-SALAS, S., RICHMOND, R., DOBZHANSKY, T. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. I. Genetic differentiation among sibling species. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.**, v. 67, n. 1, p. 225-232, 1970.
- AYALA, F. J., POWELL, J. R., TRACEY, M. L., MOURÃO, C. A., PEREZ-SALAS, S., RICHMOND, R., DOBZHANSKY, T. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genetic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. **Genetics**, v. 70, p. 113-139, 1972.
- BAND, H. T. A survey of isozyme polymorphism in a *Drosophila melanogaster* natural population. **Genetics**, v. 80, p. 761-771, 1975.
- BARKER, S. F. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase-2 in two populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetica**, v. 92, p. 165-175, 1994.
- BECKMAN, L., JOHNSON, F. M. Esterase variation in *Drosophila melanogaster*. **Hereditas**, v. 51, p. 212-220, 1964.
- BERGER, E. M. A temporal survey of allelic variation in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 67, p. 121-136, 1971.
- BERGER, E. M., CANTER, R. The esterase of *Drosophila*. I. The anodal esterases and their possible role in eclosion. **Develop. Biol.**, v. 33, p. 48-55, 1973.

- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. I. The *saltans* subgroup. **Genetica**, v. 44, n. 3, p. 313-329, 1973 a.
- BICUDO, H. E. M. C. Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*. I. The *saltans* subgroup. **Genetica**, v. 24, p. 520-552, 1973 b.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in *Drosophila prosaltans*. **Braz. J. Genet.**, v. 1, n. 1, p. 11-28, 1978.
- BRADY, J. P.; RICHMOND, R. C. An evolutionary model for duplication and divergence of esterase genes in *Drosophila*. **J. Mol. Evol.**, v. 34, p. 506-521, 1992.
- CAMPBELL, P. M., TROTT, J. F., CLAUDIANOS, C., SMYTH, K. A. Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other diptera. **Biochem. Genet.**, v. 35, n. 1/2, p. 17-40, 1997.
- CASTIGLIONI-RUIZ, L., BICUDO, H. E. M. C., CERON, C. R. Esterase patterns in four Brazilian populations of *Haematobia irritans* (Horn fly). **Cytobios**, v. 90, p. 81-94, 1997.
- CERON, C. R., Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arisonae* e seus híbridos. **Tese de Doutorado**, Departamento de Biologia, IB-USP, São Paulo São Paulo, SP, p. 142, 1988.
- CERON, C. R., SANTOS, J. R., BICUDO, C. R. The use of gelatin to dry celophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Braz. J. Genet.**, v. 15, n. 1, p. 201-203, 1992.
- CHAKRABORTI, S., MICHAEL, J. R., GURTNER, G., H., GHOSH, S., S., DUTTA, G., MERKER. A Role of a membrane-associated serine esterase in the oxidant activation of phospholipase A₂ by t-butyl hydroperoxide. **Biochem. J.**, v. 292, p. 585-589, 1993.
- CHO, Y. G., EUN, M. Y., KIM, Y. K., CHUNG, T. Y. The semidwarf gene, sd-1, of rice (*Oriza sativa* L.) I. Linkage with the esterase locus, Estl-2. **Theor. Appl. Genet.**, v. 89, p. 49-53, 1994.



- COSTA, R., NIGRO, L., DANIELI, G. A. Esterase-6 allozymes: biochemical studies of two common and one rare variant in *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genet.**, v. 21, n. 1/2, p. 191-197, 1983.
- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Methods and application to serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 121, p. 404-427, 1964.
- DUDA, O. Die sudamerikanischen *Drosophiliden* (Diptera) unter Berücksichtigung auch der anderen neotropischen sowie des nearktischen. **Arten. Arch. f. Naturgesch.**, v. 91A, p. 1-128, 1927.
- EAST, P. D. Non-specific esterases of *Drosophila buzzatii*. In: BARKER, I. S. F., STAMER, W. T. (Ed.) Ecological Genetics and Evolution. The cactus-yeast *Drosophila* Model System. Sidney: **Academic Press**, Australia, p. 323-338, 1982.
- ELVIN, C. M., WHAN, V., RIDDLES, P. W. A family of serine protease genes expressed in adult buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). **Mol. Gen. Genet.**, v. 240, p. 132-139, 1993.
- FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. **Toxicol. Lett.**, v. 82-83, p.83-90, 1995.
- GILBERT, D. G., RICHMOND, R. C., SHEEHAN, K. B. Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster* VII. Remating times of males inseminated by males having active or null alleles. **Behav. Genet.**, v. 11, n. 3, p. 194-208, 1981.
- GU, X., ZERA, A. J. Developmental profiles and characteristics of hemolymph juvenile hormone esterase, general esterase and juvenile hormone binding in the cricket, *Gryllus assimilis*. **Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem. Mol. Biol.**, v. 107, n. 4, p. 553-560, 1994.
- HATTORI, M., ADACHI, H., TSUJIMOTO, M., ARAI, H., INOUE, K. The catalytic subunit of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase is a novel type of serine esterase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 37, p. 23150-23155, 1994.
- HEALY, M. J., DUMANCIC, M. M. OAKESHOT, J. G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genet.**, v. 29, p. 365-388, 1991.

- HOPKINSON, D. A.; MESTRINER, M. A.; CORTNER, J. e HARRIS, H. Esterase D: a new human polymorphism. **Ann. Hum. Genet.**, v. 37, p. 119-137, 1973.
- HUANG, Y. S., WOODS, L., SULTATOS, L. G. Solubilization and purification of A-esterase from mouse hepatic microsomes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 28, p. 1273-1280, 1994.
- HUBBY, J. L., LEWONTIN, R. C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, n. 5, p. 577-594, 1996.
- JINDRA, M., SEHNAL, F., RIDDIFORD, L. M. Isolation, characterization and development expression of the ecdysteroid-induced E75 gene of the wax moth *Galleria mellonella*. **Eur. J. Biochem.**, v. 227, p. 665-675, 1994.
- JOHNSON, F. M., KANAPI, C. G., RICHARDSON, R. H., WHEELER, M. R., STONE, W. S., XVIII. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparision. **Univ. Texas Publ.**, v. 6615, p. 517-532, 1966.
- JOHNSON, F. M., RICHARDSON, R. H., KAMBYSELLIS, M. P. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. III. Qualitative comparison of esterases of *D. aldrichi* and *D. mulleri*. **Biochem. Genet.**, v. 1, p. 239-247, 1968.
- JOHNSON, F. M. Isozyme polymorphism in *Drosophila ananassae*: genetic diversity among island population in the south pacific. **Genetics**, v. 68, p.77-95, 1971.
- JONES, B. R., BANCROFT, H. R. Distribution and probable physiological role of esterases in reproductive, digestive, and fat-body tissues of the adult cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* boh. **Biochem. Genetics**, v. 24, n. 5/6, p. 499-508, 1986.
- KAMBYSELLIS, M. P., JOHNSON, F. M., RICHARDSON, R. H. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. IV. Distribution of the esterases in the body tissues of *D. aldrichi* and *D. mulleri* adults. **Biochem. Genet.**, v. 1, p. 249-265, 1968.
- KAPIN, M. A., AHMAD, S. Esterases in larval tissue of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): Optimun assay conditions, quantification and characterization. **Insect Biochem.**, v. 10, p. 331-337, 1980.

- KAROTAN, J., OAKESHOTT, J. G. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. **Heredity**, v. 71, p. 41-50, 1993.
- KAROTAN, J., BOYCE, T. M., OAKESHOTT, J. G. Nucleotide variation at the hypervariable esterase 6 isozyme locus of *Drosophila simulans*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 12, n. 1, p. 113-122, 1995.
- KELLY, S., S., MUTCH, E., WILLIAMS, F. M., BLAIN, P. G. Electrophysiological and biochemical effects following single dose of organophosphates in the mouse. **Arch. Toxicol.**, v. 68, p. 459-466, 1994.
- KENNEDY, B. P., AAMODT, E. J., FRANCES, L. A., CHUNG, M. A., M. A., HESCHIL, M. F., P. MCGHEE, J. D. The gut esterase gene (*ges-1*) from the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis brigssae*. **J. Mol. Biol.**, v. 299, p. 890-908, 1993.
- KERLIN, R., L., HUGHES, S. Enzymes in saliva from four parasitic arthropods. **Med. Vet. Entom.**, v. 6, p.121-126, 1992.
- KOROCHKIN, L. I., MATVEERA, N. M. Genetics of esterases in *Drosophila* of the *virilis* group. II. Sequential expression of paternal and maternal esterases in ontogenesis. **Biochem. Genet.**, v. 12, p. 1-7, 1974.
- KOROCHKIN, L. I., PANIN, V. M., PAVLOVA, G. V., KOPANTSEVA, M. R., SHOSTAK, N. G., BASHKIROV, V. N., GABITOVA, L. B., SERGEEV, P. V. A relatively small 5' regulatory region of esterase S gene *Drosophila virilis* determines the specific expression as revealed in transgenic experiments. **Biochem. Biophys. Comm.**, v. 213, n. 1, p. 302-310, 1995.
- KORT, C. A. D., GRANGER, N. A. Regulation of the juvenile hormone titer. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 26, p. 1-28, 1981.
- KRAFSUR, E. S., BLACK IV, W. C. Analysis of isozyme loci in the face fly, *Musca autumnalis* degeer. **Biochem. Genet.**, v.30, n. 11/12, 1992.
- LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAKOVAARA, S., SAURA, A. Genetic variation in natural populations of *Drosophila obscura*. **Genetics**, v. 69, p. 377-384, 1971.

- LAURIE-AHLBERG, C. C. WILTON, A. N., CURTSINGER, J. W., EMIGH, T. H. Naturally occurring enzyme active variation in *Drosophila melanogaster*. I. Sources of variation for 23 enzymes. **Genetics**, v. 102, p. 191-206, 1982.
- LAPENTA, A. S., BICUDO, H. E. M. C., CERON, C. R. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, n. 84, p. 13-29, 1995.
- LAPENTA, A. S., BICUDO, H. E. M. C.; CERON, C. R.; CORDEIRO, A. J. Esterase patterns and phylogenetic relationships of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, n. 96, p. 95-107, 1998.
- LAI-FOOK, J. SMITH, P. H. Genetics of the hemolymph esterases of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Biochem. Genet.**, v. 30, n 3/4, 1992.
- 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 *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 595-609, 1966.
- LIMA-CATELANI, A. R. A Padrão de esterase de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Tese de Doutorado em Ciências Biológicas**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Universidade Estadual Paulista, câmpus de São José do Rio Preto, SP, 126 p, 1996.
- MAGALHÃES, L. E. Description of four new species of the *saltans* group of *Drosophila* (Diptera). **Braz. J. Genet.**, v.16, p. 273-280, 1956.
- MAGALHÃES, L. E. Notes on the taxonomy, morphology and distribution of the *saltans* group of *Drosophila*, with descriptions of four new species. **Univ. Texas Publ.**, v. 6205, p. 135-154, 1962.
- MAGALHÃES, L. E., BJORBERG, A. J. S. Estudo da genitália masculina de *Drosophila* do grupo *saltans*. **Braz. J. Genet.**, v. 12, p. 79-86, 1957.
- 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.
- MARDIA, K. V., KENT, J. T., BIBBY, J. M. Multivariate analysis. **Ac. Press.**, NY, 1980.

- MATEUS, R. P. Caracterização da esterase larval em espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (grupo *repleta*). **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Universidade Estadual Paulista, câmpus de São José do Rio Preto, SP, 76 p, 1997.
- MATEUS, R. P., BICUDO, H. E. M. C., CERON, C. R. Caracterização da esterase larval em diversas espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (grupo *repleta*). **Braz. J. Genet.**, v. 19, n. 3, Supplement, p. 263, 1996.
- MIZIANTY, T. J., CASE, S. T. Demonstration of genetic control of esterase A in *Drosophila melanogaster*. **J. heredity**, v. 62, n. 6, p. 345-348, 1971.
- MORGAN, E., W., YAN, B., GREENWAY, D. PARKINSON, A. Regulation of two rat liver microsomal carboxylesterase isozymes: species differences, tissues distribution, and the effects of age, sex, and xenobiotic treatment of rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 315, n 2, p. 513-526, 1994.
- MORTON, R. A., SINGH, R. S. Variation in *Drosophila* acetylcholinesterase. **Biochem. Genet.**, v. 18, p. 439-454, 1980.
- MOURÃO, C. A. Nota preliminar sobre isoenzimas em *Drosophila willistoni*. **Ciênc. Cult.**, v. 21, n. 4, p. 720-724, 1969.
- MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J. M., FOURNIER, D. Resistance associated with point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 91, p. 5922-5926, 1994.
- NARISE, S. Esterase isozymes of *Drosophila virilis*: purification and properties of alfa and beta esterases isozymes. **Jpn. J. Genet.**, v. 48, n. 2, p. 119-132, 1973.
- NISHIKAWA, J., IZUKA, H. Numerical taxonomy of *Monascus* species based on the electrophoretic analysis of intracellular enzymes. **J. Basic Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 331-342, 1993.
- NORA, J. J., FRASER, F. C. Farmacogenética. In: __. **Genética médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 24, p. 263-267, 1991.
- OLIVEIRA, A. K., CORDEIRO, A. R. Genetics of esterase A and its relationship with developmental rate in selected strains of *Drosophila melanogaster*. **Rev. Bras. Biol.**, v. 42, n. 4, p. 725-731, 1982.

- OAKESHOT, J. G., van PARENCHT, E. A., BOYCE, T. M., HEALY, M. J.,
RUSSEL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**, v. 90, p.
239-268, 1993.
- O'GRADY, M. P., CLARK, J. B., KIDWELL, M. G. Phylogeny of the *Drosophila*
saltans species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial
DNA sequences. **Mol. Biol. Evol.**, v. 15, n. 6, p. 656-664, 1998.
- PARKASH, R., YADAV, J. P., SHAMINA. Allozymac homogeneity in Indian
populations of *Drosophila busckii*. **Korean J. Genet.**, v. 14, n. 2, p. 107-118,
1992.
- PARKASH, R., SHARMA, S., SHAMINA. Alosymic polymorphism in Indian natural
populations of *Drosophila melanogaster*. **Korean J. Genet.**, v. 15, n. 3, p. 187-
202, 1993.
- PASTEUR, N., KASTRITSIS, C. D. Developmental studies in *Drosophila*. I. Acid
phosphatases, esterases and other proteins in organs and whole-fly homogenates
during development of *D. pseudoobscura*. **Develop. Biol.**, v. 26, p. 525-536, 1971.
- PEN, J., VAN BEEUMEN, J., BEINTEMA, J. J. Structural comparison of two
esterases from *Drosophila mojavensis* isolated by immunoaffinity
chromatography. **Biochem. J.**, v. 278, p. 691-699, 1986.
- PRALAVORIO, M., FOURNIER, D. *Drosophila* acetylcholinesterase: characterization
of different mutants resistant to insecticides. **Biochem. Genet.**, v. 30, p. 77-83,
1992.
- PROCUNIER, W. S., SMITH, J. J., RICHMOND, R. C. Physical mapping of esterase-
6 locus of *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, v. 84, p. 203-208, 1991.
- RAUSCHENBACH, I. Y., GOLOSHEIKINA, L. B., KOROCHKINA, L. S.,
KOROCHKIN, L. I. Genetics of esterase in *Drosophila*. V. Characteristics of the
"pupal" esterase in *D. virilis*. **Biochem. Genet.**, v. 15, p. 531-548, 1977.
- RAUSCHENBACH, I. Y., LUKASHINA, N. S., BUDKER, V. G., KOROCHKIN, L.
I. Genetics of esterases in *Drosophila*. IX. Characterization of the JH-esterase in
D. virilis. **Biochem. Genet.**, v. 25, n. 9/10, p. 687-704, 1987.



- RICHMOND, R. C., SENIOR, A. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: Kinetics of transfer to females, decay in females and males recovery. **J. Insect Physiol.**, v. 27, p. 849-853, 1991.
- RITZ, F. R. C. Padrão de esterases em *Megaselia scalaris*. **Tese de Doutorado**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Universidade Estadual Paulista, câmpus de São José do Rio Preto, SP, 128 p, 1997.
- ROBBI, M., BEAUFAY, H. Cloning and sequencing of rat liver carboxylesterase ES-3 (egasyn). **Biochem. Biophys. Comm.**, v. 203, n. 3, 1994.
- ROBIN, C.; RUSSELL, R. J.; MEDVECZKY, K. M.; OAKESHOTT, J. G. Duplication and divergence of the genes of the α -esterase cluster of *Drosophila melanogaster*. **J. Mol. Evol.**, v. 43, p. 241-252, 1996.
- RODRIGUES PEREIRA, M. A. Q. Estudo da variabilidade genética em populações naturais de *Drosophila mercatorum pararepleta*. **Tese de doutorado**, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1979.
- ROE, R. M., JESUDASON, P., VENKATESH, K., KALLAPUR, V. L., ANSPAUGH, D. D., MAJUNDER, C. Developmental role of juvenile hormone metabolism in Lepidoptera. **Amer. Zool.**, v. 33, p. 375-383, 1993.
- ROMERO-SAAVEDRA, C. C., VALENTE, V. L.S., NAPP, M. An ecological genetic approach to the study of enzymatic polymorphisms in *Drosophila maculifrons*. **Braz. J. Genet.**, v. 18, n. 2, p. 147-164, 1995.
- SERGEEV, P. V., PANIN, V. M., PAVLOVA, G. V., KOPANTSEVA, M. R., SHOSTAK, N. G., BASHKIROV, V. N. GEORGIEV, G. P., KOROCHKIN, L. I. The expression of esterase S of *Drosophila virilis* in *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**, v.360, p. 194-196, 1995.
- SHAW, C. R. Electrophoretic variation in enzymes. **Science**, 149: 936-942, 1965.
- SCOTT, D. Inhibition of female *Drosophila melanogaster* remating by a seminal fluid protein (esterase 6). **Evolution**, v. 40, p. 1084-1091, 1986.
- SHIMADA, Y., NAGAO, T., SUGIHARA, A, IIZUMI, T., YUI, T., NAKAMURA, K., FUKASE, T., TOMINAGA, Y. Cloning and sequence analysis of an esterase locus in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 141, n. 1, p. 255-262, 1995.

- gene from *Pseudomonas* sp. KWI-56. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1174, p. 79-82, 1993.
- SPASSKY, B. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. **Univ. Texas Publ.**, v. 5721, p. 48-61, 1957.
- SPICER, G. S., FLEMING, J. E. Genetic differentiation of *Drosophila melanogaster* populations as assessed by two-dimensional electrophoresis. **Biochem. Genet.**, v. 29, n. 7/8, 1991.
- SREERAMA, L., VEERABHADRAPPA, P. S. Purification and properties of carboxylesterases from the mid-gut of the termite *Odontotermis worni*. **Insect Biochem.**, v. 21, n. 8, p. 833-844, 1991.
- STEINER, W. W. M., JOHNSON, W. C. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. **US – IBP. Island Ecosyst. Tech. Rep.**, v. 31, p. 1-21, 1973.
- STURTEVANT, A. H. Notes on the North American *Drosophilidae* with description of twenty-three new species. **Ann. Ent. Soc. Amer.**, v. 9, p. 323-343, 1916.
- STURTEVANT, A. H. The classification of the genus *Drosophila* with description of nine new species. **Univ. Texas Publ.**, v. 4213, p. 5-51, 1942.
- SULLIVAN, D. T., STARMER, W. T., CURTISS, S. W., MENOTTI-RAYMOND, M., YUM, J. Unusual molecular evolution of in *Adh* pseudogene in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 11, n. 3, p. 443-458, 1994.
- THROCKMORTON, L. H., MAGALHÃES, L. E. Research Reports on *Drosophila* Genetics, Taxonomy and Evolution. XVI. Changes with evolution of pteridine accumulations in species of the *saltans* group of genus *Drosophila*. **Genetics**, n. 6205, p. 489-504, 1962.
- TSUNO, K., AOTSUKA, K. T., OHBA, S. Further genetic variation at the esterase loci of *Drosophila virilis*. **Biochem. Genet.**, v. 22, n. 3/4, p. 323-337, 1984.
- TSUNO, K. Contribution of recombinant produced by females flies heterozygous for *Est-alfa* alleles to genic variation of *Drosophila virilis*. **Genet. Res.**, v. 51, p. 217-222, 1988.
- VEUILLE, M., KING, L. M. Molecular basis of polymorphism at the esterase-5B locus in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 141, n. 1, p. 255-262, 1995.

- WALKER, C. H., MACKNESS, M. I. Esterases: problems of identification and classification. **Biochem. Pharmacol.**, v. 32, n. 22, p. 3265-3269, 1983.
- WHYARD, S., DOWNE, A. E. R., WALKER, V. K. Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 24, n. 8, p. 819-827, 1994.
- YUM, J., STARMER, W. T., SULLIVAN, D. T. The structure of Adh locus of *Drosophila mettleri*: an intermediate in the evolution of the Adh locus in the *repleta* group of *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 8, n. 6, p. 857-867, 1991.
- ZERA, A. J., HOLTMEIER, C. L. In vivo and in vitro degradation of juvenile hormone-III in presumptive long-winged and short-winged *Gryllus rubens*. **J. Insect Physiol.**, v. 38, n.1, p. 61-74, 1992.
- ZHU, K., Y., BRINDLEY, W., A. Enzymological and inhibitory properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* knight (Hemiptera: miridae). **Insect Mol. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 245-251, 1992.
- ZHU, K., Y., CLARK, J. M. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the colorado potato beetle, *Leptonotarsa decemlineata* (say). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 24, n. 5, p. 453-461, 1993.
- ZOUROS, E., van DELDEN, W. Substrate-preference polymorphism at an esterase locus of *Drosophila mojavensis*. **Genetics**, v. 100, p. 307-314, 1982.
- ZOUROS, E.; van DELDEN, W.; ODENSE, R.; VAN DIJK, H. An esterase duplication in *Drosophila*: differences in expression of duplicate loci within and among related species. **Biochem. Genet.**, v. 20, n. 9/12, 1982.

