

Adriana Pasqueto Nascimento

Regulação da Expressão Gênica de
Esterases em Espécies de *Drosophila* do
Subgrupo *saltans*





1910001274



ADRIANA PASQUETO NASCIMENTO

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE
ESTERASES EM ESPÉCIES DE *Drosophila* DO
SUBGRUPO *saltans***

**Tese apresentada para
obtenção do Título de Doutor
em Genética.**

São José do Rio Preto - SP



ADRIANA PASQUETO NASCIMENTO

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE
ESTERASES EM ESPÉCIES DE *Drosophila* DO**

SUBGRUPO *saltans*



7.1.274/04

Tese apresentada para obtenção
do Grau de Doutor em Genética.

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

São José do Rio Preto-SP

2004



575
N244

20204000

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



UNESP

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Pós-Graduação em Genética

ADRIANA PASQUETO NASCIMENTO

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE

ESTERASES EM ESPÉCIES DE *Drosophila* DO

SUBGRUPO *saltans*

Nascimento, Adriana Pasqueto.

Regulação da expressão gênica de esterases em espécies de
Drosophila do subgrupo *saltans*. Adriana Pasqueto Nascimento. – São
José do Rio Preto : [s.n.], 2004.

148 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Hermione Elly Melara de Campos Bicudo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. *Drosophila*. 2. Esterases. 3. Regulação gênica. 4. Enolase. 5.
Desenvolvimento I. Bicudo, Hermione Elly Melara de Campos. II.
Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575

São José do Rio Preto - SP

2004



Adriana Pasqueto Nascimento

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ESTERASES EM ESPÉCIES DE

Drosophila* DO SUBGRUPO *saltans

TESE APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM GENÉTICA.

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora:

2º Examinador:

3º Examinador:

4º Examinador:

5º Examinador:

São José do Rio Preto-SP, 19/02/2004



O presente 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 (IBILCE/UNESP), com auxílio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) .



Dedico este trabalho

*'a Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo,
a quem serei eternamente grata, pela confiança,
dedicação, pela oportunidade de tê-la como orientadora,
por todos estes anos de convivência, aprendizado, enfim,
por tudo.*

“Não se trata de descobrir e de percorrer sozinho uma única vez, uma pista, mas de traçar e de construir, para uso de muitos, uma longa estrada”.

L. J. Lebrez

AGRADECIMENTOS

Ao final de mais esta etapa de minha vida, quero agradecer às pessoas que contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho:

à Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, os meus sinceros agradecimentos pela confiança, dedicação, apoio e pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação durante estes preciosos anos,

à Profas. Dras. Cláudia M. A. Carareto e Lilian Madi-Ravazzi, pela amizade, pela participação na banca, por todos esses anos de convivência na graduação e pós-graduação,

às Profas. Dras. Maria Luiza Stiwantes e Maura Helena Manfrim, por aceitarem participar da banca e pela atenção dispensada na análise do trabalho,

às Profas. Dras. Mary M. Itoyama, Marlene Kobayashi, Eliana Morieli Versute, Maria Tercília V. de A. Oliveira e aos Profs. Drs. Carlos Roberto Ceron e Antônio José Manzato, pela amizade, incentivo e disponibilidade para ajudar sempre que precisei,

às Profas. Dras. Ana Elizabete Silva e Cláudia M. A. Carareto, responsáveis pela Coordenação do Curso de Pós-Graduação no período de realização deste trabalho, pela atenção e orientação na parte burocrática,

ao Depto. de Biologia e à direção do IBILCE/UNESP, pelo apoio e disposição das condições materiais necessárias,

à Sra. Simone Carvalho, funcionária do Departamento de Biologia e à Sra. Rosana M. G. Ferro e ao Sr. Oscar J. Marques, funcionários da Seção de Pós-Graduação, pelo

atendimento atencioso e eficiente,

ao Sr. Paulo Antonio Maziero e ao Sr. Sebastião Dias Barbosa, pelos serviços prestados na preparação do meio de cultura,

às Srs. Maria do Carmo Junqueira e Elza M. Sato e demais funcionárias da Biblioteca, pelos excelentes serviços prestados,

aos funcionários do Laboratório de Recursos audiovisuais, pelo atendimento sempre atencioso,

à Ester Tartarotti, Luciane Madureira, Ana Paula Fresh, Mila Alves, Luís Gustavo, Rosa Maria, Paula e demais colegas do curso de Pós-Graduação, por compartilharem os mesmos ideais,

às amigas do Laboratório de Vetores Alessandra T. Laranja, Alessandra A. Bernardo, Cássia Cardoso de Oliveira, Marluci Monteiro Guirado, Lilian Castiglioni Ruiz, Rita de Cássia e Cibele Abdo-Banhos, pela agradável convivência e companheirismo,

aos meus amigos Flávia Roberta, Eliana Santos, Patrícia, Thaísa, Thaíse e Ulisses Martins Basílio, pela amizade e incentivo a mim sempre dedicados,

ao Dr. Greene e ao Vitor Marcel Faça, do Centro de Estudos de Proteína da USP de Ribeirão Preto, pela assistência técnica no sequenciamento e identificação da proteína,

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro,

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante os quatro anos deste Doutorado,

à Profa Ana Maria, do departamento de zoologia, pela amizade, pelo incentivo e carinho,

aos meus irmãos Mauro César, Alexandre e Antonio Filho, pelo carinho e apoio,

à minha prima Cristiane Kelly Bueno e ao meu tio Tufih José da Costa por todos esses anos que compartilhamos as alegrias e dificuldades do a dia-a-dia,

ao meu tio José Soares, tia Cida e meus primos Josiane, Juciele e Juliano, pelo entusiasmo, amor e carinho a mim dedicados,

aos meus pais, Antonio e Maria Maura, que apesar da distância estão sempre presentes e merecem minha eterna gratidão pelo amor, carinho e por tudo,

ao Sr. Tartarotti e à Sra. Helena Tartarotti, cujo incentivo e apoio foram constantes,

ao Elder Tartarotti, pelo auxílio na impressão da Tese, pelo amor e compreensão,

a Deus, por tudo e por mais esta oportunidade

Muito Obrigada!!



SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
I.1. As esterases: classificação.....	13
I.2. Funções das esterases.....	15
I.3. A expressão das esterases no desenvolvimento e nos tecidos	20
I.4. Bases genéticas da expressão das esterases.....	23
I.5. O subgrupo <i>saltans</i> de <i>Drosophila</i>	28
II. OBJETIVOS.....	30
III. ARTIGO 1. Further study on the esterase patterns of sibling <i>Drosophila</i> species in the <i>saltans</i> subgroup: interspecific variation of expression in the development	32
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introduction.....	36
Materials and methods.....	38
Results.....	41
Discussion.....	50
Acknowledgments.....	54
References.....	55
IV. ARTIGO 2. Biological characterization of esterase bands codified by putative homologue genes in three sibling <i>Drosophila</i> species from the <i>saltans</i> subgroup (<i>saltans</i> group)	59
Resumo.....	61
Abstract.....	62

Introduction.....	63
Materials and methods.....	65
Results.....	69
Discussion.....	77
Acknowledgments.....	82
References.....	83
V. ARTIGO 3. Biological and molecular characterization of the est-33 esterase, an enolase in <i>Drosophila austrosaltans</i> (<i>saltans</i> group, <i>saltans</i> subgroup)	88
Resumo.....	90
Abstract.....	91
Introduction.....	92
Materials and methods.....	93
Results.....	99
Discussion.....	105
Acknowledgments.....	110
References.....	111
VI. DISCUSSÃO GERAL.....	116
VII. CONCLUSÕES.....	128
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
IX. RESUMO.....	143
X. ABSTRACT.....	146

I. INTRODUÇÃO GERAL



I. INTRODUÇÃO GERAL

I.1 - As esterases: classificação

A técnica mais comum para estudar as variações enzimáticas é a eletroforese em gel. Esta técnica, que constitui o primeiro método prático para análise da variação genética ao nível bioquímico, tem sido utilizada pelos geneticistas, em seus estudos, desde 1947 (Aldridge, 1953). Atualmente, são utilizados vários tipos de géis para separação enzimática, 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 e outros compostos. O fato das enzimas com atividade esterásica poderem 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). Daí a relação entre ação de inseticidas, resistência e esterases.

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. Entre as carboxilesterases mais conhecidas encontram-se as que ocorrem no fígado de mamíferos (Huang et al., 1994; Morgan et al., 1994) e as que ocorrem em *Drosophila melanogaster* (Collet et al., 1990; Dumancic et al., 1997; Odgers et al., 2002; Arbeitman et al., 2002).

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. Este 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 que é impedida pela deficiência dessa enzima, 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.

1.2 - Funções das esterases

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 estão envolvidas em vários processos metabólicos, incluindo os processos digestivos (Kapin & Ahmad, 1980; Sreerama & Veerabhadrapa, 1991; Kerlin & Hugues, 1992; Argentine & James, 1995), processos reprodutivos (Richmond & Senior, 1991; Costa et al., 1983; Scott, 1986; Karotam et al., 1995), regulação dos níveis do hormônio juvenil (Kort & Granger, 1981; Zera & Holtmeier, 1992; Gu & Zera, 1994) e degradação de inseticidas (Mutero et al., 1994; Whyard et al., 1994; Feyereisen, 1995).



Em *Aedes aegypti*, Argentine e 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 e 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. Neste caso, também, os autores interpretaram os dados como indicativos da participação destas enzimas nos processos digestivos. McGher (1992, apud Kennedy et al., 1993) 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 e 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, e é produzida no ducto ejaculatório anterior do aparelho reprodutivo dos machos adultos em grande quantidade, expressando-se também, em outros tecidos, mais fracamente. Nesta espécie, ela desempenha uma função importante, sendo transferida para o sistema reprodutivo das fêmeas durante a cópula



(Richmond & Senior, 1991; 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-vacenil acetato, um lipídeo produzido também pelos machos. A esterase hidrolisa este lipídio 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 cruzadas, após dez minutos da inseminação.

Em estudos que utilizaram outras espécies de *Drosophila*, como *D. aldrichi* (Jhonson et al., 1968, Kambysellis et al., 1968), *D. dunni* (Carrasco et al., 1984), *D. arizonae* e *D. mulleri* (Ceron, 1988), também foram encontradas esterases específicas do sexo masculino, que podem estar relacionadas com a biologia reprodutiva. O último autor encontrou uma α -esterase (Est-7) exclusiva de fêmeas de *D. arizonae*, evidenciando a necessidade de conhecer mais acerca de enzimas que parecem ser de suma importância para os organismos, já que ocorrem em diversas fases do desenvolvimento e em diversos tecidos, além dos aspectos fisiológicos discutidos.

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 regulador importante na metamorfose desses 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, necessária para que a metamorfose seja completada.



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 e 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.

Alguns trabalhos, na literatura, relatam a ocorrência de esterases específicas de fases anteriores à fase adulta. A presença de uma esterase em 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.



Em *Drosophila mulleri* e *D. arizonae* 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 de 3º estágio e pupas. A caracterização bioquímica dessa banda pelo uso do PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), indicou tratar-se de uma serina-esterase, possivelmente uma acetilesterase, que poderia estar envolvida no metabolismo do hormônio juvenil, segundo o autor.

A variabilidade da atividade da α e β -esterases durante o desenvolvimento de *D. rajasekari* foi analisada por Prakash e Reddy (1978). Foram analisados ovos, larvas em 4 sub-estádios, pupas em 4 sub-estádios e adultos de 4 idades. Segundo os autores, os ovos foram caracterizados pela ausência total de α e β -esterases, enquanto a atividade máxima de ambas as enzimas foi observada no estágio de pupa. Em *Aedes aegypti*, Lima-Catelani et al. (no prelo) verificaram a existência de 10 α -esterases exclusivas das fases que precedem a fase adulta, das quais oito ocorrem exclusivamente na fase larval, uma em larvas e pupas e, a última, exclusivamente em pupas. Quanto às β -esterases, foram observadas quatro bandas, das quais três exclusivas da fase larval e uma, das fases larval e pupal. Nessa espécie, as fases larvais são as que apresentam o maior número de bandas esterásicas. Ao contrário, nas espécies de *Drosophila* do subgrupo *saltans* o maior número de bandas expressa-se na fase adulta (Nascimento & Bicudo, 2000).



I.3 - A expressão das esterases no desenvolvimento e nos tecidos

A atividade dos genes nos tecidos reflete a atuação dos mecanismos de regulação no desenvolvimento e na diferenciação celular. No caso das esterases, além da regulação diferencial, sua distribuição nas diferentes partes do corpo e tecidos de um organismo pode indicar seu papel fisiológico. Em *Drosophila*, as esterases têm sido focalizadas em muitos estudos mostrando ser tecido-específicas e atuar ao longo do desenvolvimento.

Sasaki (1974) analisou as α e β -esterases de *Drosophila virilis* durante o desenvolvimento e sua distribuição nas partes do corpo. Os dados do autor indicaram alta atividade das α e β -esterases nas larvas de 3º estágio e adultos, e baixa atividade, durante o período de pupa.

Pasteur e Kastritsis (1971) analisaram a presença de esterases nos tecidos, durante o desenvolvimento de *D. pseudoobscura*, tendo observado mudanças quantitativas e qualitativas, dessas enzimas, no corpo gorduroso e na hemolinfa dessa espécie.

Karotam e Oakeshott (1993) analisaram a produção da EST-6 em *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* e *D. mauritiana*, em vários estádios de desenvolvimento e em diferentes tecidos, encontrando expressão maior no ducto ejaculatório dos machos adultos. A comparação do grau de atividade em diferentes linhagens das três espécies mostrou que estas diferem, sendo *D. melanogaster* e *D. simulans* portadoras de maior atividade do que *D. mauritiana*. Esses resultados evidenciaram que mudanças evolutivas resultam na alteração da expressão gênica das esterases.



Healy *et al.* (1991) também analisaram a expressão temporal e tecidual de esterases, em *D. melanogaster*. Nesse trabalho, os autores verificaram que as carboxilesterases mostram padrões de expressão temporal variáveis, sendo geralmente encontradas nas larvas, enquanto as colinesterases e acetilcolinesterases são mais características de pupas e adultos. Os autores verificaram ainda que o maior número de isozimas está na parede do corpo da larva e no seu trato digestivo. As carboxilesterases estão distribuídas em muitos tecidos enquanto as colinesterases estão geralmente associadas com tecido nervoso e tecidos digestivos.

Outros trabalhos discutem a distribuição tecidual das esterases. Kambysellis *et al.* (1968) analisaram essa distribuição em *D. aldrichi* e *D. mulleri*. Segundo estes autores, as funções biológicas das esterases são sugeridas por sua presença em certos tecidos. Os resultados mostraram que, nos mesmos tecidos, ambas as espécies continham enzimas similares. Isto levou os autores a concluir que as referidas enzimas são homólogas.

Lunday e Farmer (1983) analisaram a localização da esterase-5 em *D. pseudoobscura*, tendo verificado sua presença predominante na cabeça e tórax. A atividade enzimática mostrou-se maior na hemolinfa (61%) e nos olhos (39%). Arnason e Chambers (1984) também estudaram a atividade da EST-5 de *D. pseudoobscura*, nas três partes do corpo, cabeça, tórax, abdome e também em órgãos. Os autores observaram um alto nível de atividade da EST-5 nos olhos e nos tecidos abdominais. Esses autores confirmaram o modelo de homologia entre EST-5 de *D. pseudoobscura* e EST-6 de *D. melanogaster*, através da especificidade ao substrato.



Em adultos de *D. buzzatii* (grupo *repleta*), East (1982) verificou a presença de duas esterases principais que foram designadas 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 se expressariam 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.

Entre os invertebrados, outros insetos além da *Drosophila*, foram estudados quanto a expressão da atividade enzimática das esterases. Entre eles incluem-se, o térmita *Odontotermes horni* w. (Sreerama & Veerabhadrapa, 1991); o *Triatoma infestans* (Tavares et al., 1998); 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 et al., no prelo; Sousa-Polezzi & Bicudo, no prelo; Laranja et al., 2003)) e a mariposa *Galleria mellonella* (Jindra et al., 1994).

Em *Triatoma infestans*, Tavares et al. (1998) mostraram a presença de 6 bandas esterásicas na hemolinfa e túbulos de Malpighi desse organismos, sendo EST-1, 4, 5 e 6 encontradas exclusivamente na hemolinfa e EST-2 e 3 encontradas nos túbulos de Malpighi. Na hemolinfa dos adultos de *Lucilia cuprina*, Lai-Fook



& Smith (1992) identificaram 10 bandas esterásicas, produzidas por dois locos genéticos.

O padrão de esterases foi estudado no decorrer do desenvolvimento de duas espécies do gênero *Aedes*, *A. aegypti* e *A. albopictus*, por Lima-Catelani (1996), objetivando verificar alterações decorrentes de mecanismos reguladores. As fases analisadas foram as de larva de 2º, 3º e 4º estádios, pupas e adultos de ambos os sexos, tendo sido encontrado um número maior de bandas expressas nas fases larvais das duas espécies, com redução das suas frequências entre as fases de larva e pupa e entre as fases de pupa e adulto.

I.4- Bases genéticas da expressão das esterases

Conhece-se um grande número de mecanismos pelos quais os organismos podem gerar múltiplas formas moleculares de enzimas. Duas categorias gerais podem ser distinguidas: aquelas que são o resultado de mecanismos genéticos e aquelas originadas por mecanismos epigenéticos. Mecanismos genéticos são aqueles que geram enzimas que são usualmente modificadas ao nível do genoma e transcritas pelo RNAm, ou ao nível pós-transcricional, afetadas por elementos genéticos reguladores. Os mecanismos epigenéticos dão origem a enzimas que são usualmente afetadas ao nível traducional ou pós-traducional. Este último mecanismo pode incluir os seguintes processos: ligação de polipeptídeos simples que variam o número e o tipo de grupos prostéticos (por exemplo, coenzimas, metais bivalentes, carboidratos), conjugação ou deleção de moléculas com grupos reativos (por exemplo, grupos amino, carboxil, hidroxil de resíduos de aminoácidos), adenilação, fosforilação, alterações na estrutura terciária ou



quaternária de um polipeptídeo, formação de polímeros de sub-unidade simples, proteólise parcial de polipeptídeos originais e outros.

Algumas esterases foram, até o presente, objeto de estudos genéticos mais intensos. Entre elas mencionamos a esterase-6 (EST-6) de *D. melanogaster*. Esta enzima apresenta duas variantes eletroforéticas principais, atribuídas à presença de dois alelos codominantes. Ambos são freqüentemente 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 várias fases da vida, em diversos tecidos dessa espécie 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 (Karotam & 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 envolvido na herança da enzima (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 seqüências de aminoácidos da esterase S de *D. virilis* e da esterase 6 de *D. melanogaster* revelou 50% de homologia.

Tamarina et al. (1997) estudaram a localização de elementos que regulam a expressão dos genes Est-5B de *Drosophila pseudoobscura* e Est-6 de *D. melanogaster* (espécies derivadas de um ancestral comum). Para isso, os autores analisaram linhagens de *D. melanogaster* transformadas com os genes Est-5B e Est-6, utilizando um gene repórter *lacZ* (Est-5B/*lacZ* e Est-6/*lacZ*). Os resultados mostraram que a expressão da β -galactosidase (Est-5B/*lacZ*) ocorreu na antena, nos palpos maxilares, corpo gorduroso e glândulas salivares, de ambos os sexos, enquanto a expressão da β -galactosidase (Est-6/*lacZ*) ocorreu na antena, palpos maxilares, sacos aéreos da cabeça e tórax, glândulas salivares de ambos os sexos, no bulbo ejaculatório e no ducto ejaculatório dos machos. Portanto, os autores verificaram a similaridade no padrão de expressão dos genes Est-6/*lacZ* e Est-5B/*lacZ*, nos dois primeiros tecidos. Entretanto, resultados de mutagênese por deleção, *in vitro*, mostraram que os dois genes têm uma organização diferente dos elementos reguladores que controlam a expressão conservada no 3º segmento da antena e palpos maxilares. Esses resultados sugerem que a conservação do padrão de expressão dos genes que se originaram evolutivamente de um ancestral comum



não é necessariamente acompanhada por uma preservação dos elementos reguladores correspondentes.

De acordo com Odgers et al. (2002), diferenças qualitativas ou quantitativas na expressão gênica podem ser fontes importantes de variação fenotípica adaptativa. Contudo, segundo os autores, há poucos dados empíricos sobre a genética de populações dos polimorfismos reguladores e sua contribuição para a variação fenotípica. Esses autores analisaram a variação de sequência da região promotora 5' e as diferenças de expressão da esterase 6 de *D. melanogaster*, encontrando dois haplótipos P1 e P7, que diferem em 14 sítios de uma região de 325 pares de base, e que estão associados com 15-20% de diferença na atividade da Est-6 nos machos.

Outros 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) admite que os alelos deste locus podem produzir mutantes diferentes dos tipos alélicos parentais por uma suposta recombinação intragênica nas fêmeas heterozigotas; isso não ocorreria nem em fêmeas 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 seqüências de cromossomos consideradas (padrão e inversão J) e a frequência alélica em cada arranjo foi significativamente diferente entre as duas populações.

No que se refere às esterases, alguns estudos mostram a ocorrência de polimorfismo por duplicação e diferenciação gênicas. Por exemplo, em *Drosophila mojavensis*, Zouros e van Delden (1982) detectaram duas beta esterases, EST-4 e EST-5 que 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 seqüências N-terminal são bastante idênticas, indicando, claramente, sua origem comum.

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 e Richmond (1992) compararam as seqüências de DNA codificadoras e flaqueadoras, 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*.



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 espécies do subgrupo *saltans* de *Drosophila* sua aplicação também foi realizada em estudos filogenéticos (Nascimento & Bicudo, 2002).

1.5 - O subgrupo *saltans* de *Drosophila*

O grupo *saltans* foi estabelecido por Sturtevant (1942) como membro do subgênero *Sophophora*. O grupo constitui-se de 21 espécies sendo o subgrupo *saltans* composto por sete espécies: *D. prosaltans* Duda (1927), *D. lusaltans* Magalhães (1962), *D. saltans* Sturtevant (1916), *D. nigrosaltans* Magalhães (1962), *D. septentriosaltans* Magalhães e Buck (1962, apud Magalhães, 1962) *D. austrosaltans* Spassky (1957) e *D. pseudosaltans* Magalhães (1956). Sua distribuição ocorre do México ao Rio Grande do Sul e Paraguai.

As espécies do grupo *saltans* foram analisadas filogeneticamente quanto ao acúmulo do pigmento pteridina, por Throckmorton e Magalhães (1962), ao isolamento reprodutivo (Bicudo, 1973 a), à variabilidade cromossômica devida a inversões (Bicudo, 1973 b), e, mais recentemente, quanto às seqüências de DNA mitocondrial e nuclear (O'Grady et al., 1998). O'Grady et al. (1998) concluíram que, da mesma forma que os estudos morfológicos anteriores, as relações



filogenéticas dentro do subgrupo *saltans* não foram satisfatoriamente resolvidas pelos dados moleculares.

Nascimento & Bicudo (2002), com base nos padrões de esterase, analisaram as relações filogenéticas entre 4 espécies do subgrupo *saltans* de *Drosophila* (*D. prosaltans*, *D. saltans*, *D. autrosaltans* e *D. septentriosaltans*). Os resultados corroboraram os obtidos quanto ao polimorfismo de inversões, considerado por Bicudo (1973b), como a característica mais adequada para fins de análise filogenética.



II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo, aprofundar o conhecimento da expressão das esterases em espécies do subgrupo *saltans*, cujo padrão foi previamente descrito por Nascimento & Bicudo (2002). Esse aprofundamento envolveu, basicamente, a análise das esterases no desenvolvimento, de larvas a adultos, a análise de sua presença e grau de expressão em partes do corpo e órgãos e uma análise mais detalhada da atividade de algumas bandas, uma das quais foi seqüenciada.

Esses estudos visaram à detecção da presença de mecanismos reguladores que mostrassem não só a variação da expressão nas condições mencionadas, mas que mostrassem também aspectos da divergência das três espécies crípticas analisadas (*D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. austrosaltans*).

Os resultados obtidos estão reunidos em três trabalhos preparados para publicação, sob os títulos:

- 1- Further study on the esterase patterns of sibling *Drosophila* species in the *saltans* subgroup: interspecific variation of expression in the development
- 2- Biological characterization of esterase bands codified by putative homologue genes in three sibling *Drosophila* species from the *saltans* subgroup (*saltans* group)
- 3- Biological and molecular characterization of the EST-33 esterase, an enolase in *Drosophila austrosaltans* (*saltans* Group, *saltans* Subgroup)



III. ARTIGO 1

Further study on the existence patterns of sibling *Oncometopha* species in the *salicaria* subgroup: interspecific variation of expression in the development

Adriana Gasquet-Pacheco de Almeida Pily, Michel de Campos Garcia

Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 687, 21941-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Av. 24-A, 13506-900, Jundiaí, SP, Brasil
E-mail: pily@biologia.fiocruz.br

Key- Words: *Oncometopha*, salicaria group, expression, development

III. ARTIGO 1

III. ARTIGO 1

Further study on the esterase patterns of sibling *Drosophila* species in the *saltans* subgroup: interspecific variation of expression in the development

Adriana Pasqueto Nascimento & Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Key Words: *Drosophila saltans* group, esterases, development



Resumo

No presente estudo, foi analisada a variação do padrão de esterases nos estádios de larva e pupa de três espécies do subgrupo *saltans* de *Drosophila*: *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. austrosaltans*. Casulos vazios de pupas também foram analisados, com o mesmo propósito. Entre as 32 bandas esterásicas, previamente detectadas nos adultos destas espécies e tentativamente incluídas em nove locos, 17, incluídas em sete dos nove, foram observadas nos géis analisados neste estudo. Os resultados mostraram que, além de expressar o maior número de bandas esterásicas, os adultos exibiram o maior grau de expressão de algumas das bandas partilhadas pelas três espécies. Contudo, uma das bandas, a EST-34, mostrou frequência de expressão significativamente maior em larvas e pupas do que em adultos. A ocorrência de divergência entre as espécies, no que se refere ao controle genético das esterases, foi observada em relação a três alelos do loco 3. Embora as bandas correspondentes estivessem presentes nos adultos das três espécies, elas se expressaram nos estádios prévios do desenvolvimento, apenas em *D. prosaltans* (EST-12 and EST-13) ou em *D. austrosaltans* (EST-15). Cinco novas bandas esterásicas foram detectadas, estando todas presentes nos casulos. Entre elas, uma foi observada também nas larvas, e outra, nas larvas e pupas. Os presentes resultados mostraram que, no processo evolutivo que originou as espécies crípticas analisadas, ocorreram mudanças no padrão de esterases e na regulação da expressão de algumas delas, no desenvolvimento.



Abstract

In the present study, the esterase pattern variation was analyzed in larval and pupal stages of three species from the *Drosophila saltans* subgroup: *D. prosaltans*, *D. saltans* and *D. austrosaltans*. Empty pupal cases were also examined with the same purposes. Among the 32 esterase bands, previously detected in the adults of those species and tentatively included in nine loci, 17 from seven loci were expressed in the gels analyzed in this study. Two loci (loci 2 and 4) were not expressed at all. The results showed that, in addition to expressing the highest number of esterase bands, the adults exhibited the highest degree of expression of some bands, in the three species. However, one of the bands, the EST-34, showed significantly greater frequency of expression in larvae and pupae than in adults. One observation suggesting the occurrence of divergence among the species, in the genetic control of the esterases, was carried out in relation to three genes from the locus 3. Although the bands corresponding to them were previously detected in adults of the three species, these genes were expressed in previous developmental stages exclusively in *D. prosaltans* (EST-12 and EST-13) or in *D. austrosaltans* (EST-15). Five new esterase bands were detected in the present study, being all of them detected in the empty pupal cases. Among the five, one was also detected in larvae, and another in larvae and pupae. The present results showed that, in the evolutionary process that originated the sibling analyzed species, changes occurred in the esterase pattern and in the expression regulation of some esterase bands, during development.



Introduction

Gene-enzyme systems serve as a model for studying gene regulation during the developmental history of an organism. By means of the electrophoretic techniques we may be able to understand more precisely the mechanism of development, particularly that of switching the genes on and off, since any change in enzyme pattern can be considered as being directly determined by genic function (Sasaki, 1974; Karotam & Oakeshott, 1993; Campbell et al., 2003). Further, studies on enzyme systems during ontogeny provide a valuable means to understand basic changes occurring during differentiation, enabling to understand phylogenetic relationships within a species group (Prakash & Reddy, 1978).

In *Drosophila*, several species were analyzed in relation to the ontogenetic variation of the esterase pattern. Sasaki (1974) studied it in *D. virilis*, observing variation in the expression of α and β esterases, but no specific band was detected in a specific stage. The intensity of the enzyme activity changed remarkably during development, attaining the maximum degree in the pupal stage. Pasteur & Kastritsis (1971) examined the developmental changes of α and β esterases in *D. pseudodobscura*. They found marked developmental variation in α -esterases but not in β esterases. Another study was carried out in *D. mojavensis* by Pen et al. (1986). The authors detected, in this species, a very polymorphic larva-specific enzyme.

The literature shows other studies on esterase patterns during development of *Drosophila*. In every case, developmental specificities have been detected. In the present study, the electrophoretic technique was used to analyze the esterase

pattern variation during development, in three species from the *Drosophila saltans* subgroup. Adults of four of the seven species included in the subgroup by Magalhães (1962) were previously studied as to their esterase patterns by Nascimento & Bicudo (2002): *D. prosaltans*, *D. saltans*, *D. austrosaltans* and *D. septentriosaltans*. Thirty-four esterase bands were detected in them and tentatively included in nine genetic loci. On the basis of the results, the phylogenetic relationships of the four species were analyzed, showing greater proximity among *D. saltans*, *D. septentriosaltans* and *D. austrosaltans* than between any of them to *D. prosaltans*.

We report here the results of extending the study to the larval and pupal stages. Empty pupal cases were also analyzed since other authors have mentioned the finding of esterase bands in them. As observed in other species, the esterase pattern and the degree of band expression varied during development of the species in the *saltans* subgroup, showing also the occurrence of genetic changes in the differentiation process of the species analyzed.

Materials and methods

Species and strains used

The strains of species of *Drosophila* used in this work are listed in **Table 1**. They have been maintained in laboratory in bottles containing cornstarch agar culture medium, at the temperature of $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The flies of different bottles in the stocks were mixed at intervals of about 3 months aiming to decrease the inbreeding effects.

Electrophoresis

The sample preparation for detecting the presence of bands during development involved the use of three third instar larvae, two pupae and four empty pupal case, separately squashed in 20 μl of the buffer solution.

The esterase patterns were analyzed in polyacrylamide gels using a 12% separating gel and a 4% stacking gel (Laemmli, 1970). For identification of the esterases, the gels were soaked for 45 min in 50ml 0.1 M sodium phosphate, pH 6.2, at room temperature ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), placed for one hour in staining solution prepared with 50 ml of the sodium phosphate solution, 15 mg of β -naphthyl acetate, 20 mg of α -naphthyl acetate, 60 mg of Fast Blue RR and 5 ml of N-propanol (Johnson et al., 1966; Steiner & Johnson, 1973). Electrophoresis was performed for 4.0 h at 25°C using a constant 200V. The running buffer used was 0.1 M Tris-glycine at pH 8.3.

Tabela 1. Strains and species used.

Species	Strains	Geographical origin
<i>D. prosaltans</i>	(P _{Est})	Margem do Rio Grande, SP, Brazil
	(P _{I60})	Santana do Riacho, MG, Brazil
	(P _{BG})	Barra Grande, RS, Brazil
	(P _{MS})	Morro Santana, RS, Brazil
	(P _E)	Eldorado, RS, Brazil
	H 4021 (P _{2a})	Piedras Blancas, Costa Rica
	H 112.2 (P ₄)	Sangre Grande, Trinidad
	H 191.68 (P ₅)	Bucaramanga, Colombia
<i>D. austrosaltans</i>	H 2536.4 (A)	Pirassununga, SP, Brazil
<i>D. saltans</i>	H 180.40 (S ₁)	San José, Costa Rica
	H 29.6 (S _{2a})	San Salvador, El Salvador
	H 1911.5 (S ₃)	Guatemala, Guatemala
	H 1911.7 (S ₇)	Chilpancingo, Mexico
	(S _M)	Mexico, Mexico
	(Ch)	Chilpancingo, Mexico

Polyacrylamide gels were air dried at room temperature, as described by Ceron et al. (1992).

Inhibition test for biochemical classification of new bands involved the use of malathion (0.7 mM solution) and eserine (0.1 mM solution). In the tests, polyacrylamide gels were preincubated for 1 h in sodium phosphate solution containing the inhibitor and then treated with the staining solution also containing the inhibitor. Using these tests, the esterases in gels might be basically classified as carboxylesterases, cholinesterases, arilesterases and acetylerases. Carboxylesterases are primary target of malathion (organophosphorous) that inhibits them, blocking their visualization in the gels. Cholinesterases are inhibited by organophosphorous insecticides and eserine sulphate; the last substance is then responsible for distinction between carboxylesterases and cholinesterases.

Statistical analyses

Statistical analysis for comparison of adults, larvae and pupae as to the frequency of EST-34 esterase band involved the use of the $\arcsen(p)^{1/2}$ transformation, including exploratory analysis of data and analysis of variance (Bussab & Morettin, 1985; Zar, 1999).



Results

Esterase bands shared by larval, pupal and adult stages

Adults from four species from the *saltans* subgroup (*D. prosaltans*, *D. saltans*, *D. austrosaltans* and *D. septentriosaltans*) showed 34 esterase bands numbered from the less anodic to the more anodic end of the gel (Nascimento & Bicudo, 2002). The bands were tentatively included in nine loci. In the present study, larvae and pupae were also analyzed as to the esterase bands in three of those species. *D. septentriosaltans* was not included, since the single available strain was lost. The exclusion of *D. septentriosaltans* decreased the number of bands from adults to 32, since two bands were specific from that species.

Table 2 lists the esterase bands of adults as described by Nascimento & Bicudo (2002) and their presence or absence in larvae and pupae, as observed in the present study.

The bands corresponding to the genes included in the loci 2 and 4 were not expressed in the larvae and pupae examined.

Figure 2 shows the esterase patterns of adults, larvae and pupae detected in this study. Data on esterase bands observed in empty pupal cases are also shown.

The β -esterase EST-1, from the locus 1, was observed in larvae and pupae from the species *D. prosaltans* and *D. saltans*. EST-2 band, included in the same locus, was detected exclusively in *D. septentriosaltans* adults (Nascimento & Bicudo, 2002), species that was not analyzed in the present study. The other band specific from this species is EST-19, from the locus 4.

Table 2. Distribution, in larvae and pupae, of the esterase bands previously detected in adults. *D. prosaltans* (P), *D. saltans* (S) and *D. austrosaltans* (A). a=adults; l=larvae; p=pupae. BC=biochemical classification; α =alpha-esterase; β =beta-esterase; α/β =alpha/beta-esterase; CE=carboxylesterase; Ace=acetylerase; ChE=cholinesterase.

Loci	Bands	BC	Espécies								
			P			S			A		
			a	l	p	a	l	p	a	l	p
1	EST-1	β ,	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	*EST-2	β ,	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	EST-3	α , CE	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EST-4	α , CE	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EST-5	α , CE	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	EST-6	α , CE	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EST-7	α , CE	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	EST-8	α , CE	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EST-9	α , CE	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	EST-10	α , CE	+	-	-	+	-	-	-	-	-
3	EST-11	α , Ace	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EST-12	α , Ace	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	EST-13	α , Ace	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	EST-14	α , Ace	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EST-18	α , Ace	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EST-15	α , Ace	+	-	-	+	-	-	+	+	+
4	EST-16	β , CE	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EST-17	β , CE	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	*EST-19	β , CE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EST-20	β , CE	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	EST-21	β , CE	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5	EST-22	β , CE	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	EST-23	β , CE	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	EST-24	β , CE	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	EST-25	β , CE	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EST-26	β , CE	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	EST-27	β , CE	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	EST-28	α , Ace	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EST-29	α , Ace	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	EST-30	α , Ace	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	EST-31	β , CE	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EST-32	β , CE	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8	EST-33	α , ChE	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	EST-34	α/β , ChE	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Bands exclusively expressed in *D. septentriosaltans*.

From the locus 3, which includes the genes codifying the α -esterases, acetylerases, EST-11 to EST-15 and EST-18, only EST-12, EST-13 and EST-15 were observed in larvae and pupae, being EST-12 and EST-13 in *D. prosaltans* and EST-15 in *D. austrosaltans*. They were detected in larvae and pupae, showing degree of activity (evaluated by the degree of staining and thickness of the bands) greater in pupae; sometimes they were not present in larvae. The other bands were exclusive of *D. saltans* adults.

The two genes included in the locus 5 (genes codifying the β -esterases, carboxylesterases EST-22 to EST-27), were expressed in both stages with greater activity in larvae than in pupae. The same was observed in relation to the locus 6 (it includes the genes codifying the α -esterases, acetylerases bands EST-28 to EST-30, being EST-29 and EST-30 exclusive from *D. austrosaltans* and *D. prosaltans*, respectively). The three bands were expressed in higher level in larvae than in pupae, but , in both, in lower level than in adults.

The two genes from the locus 7 (genes codifying the β -esterases, carboxylesterases EST-31, exclusive of *D. saltans* and *D. austrosaltans*, and EST-32, exclusive of *D. prosaltans*), were expressed at similar levels in larvae and pupae of the respective species, except EST-31, which sometimes showed greater activity in *D. saltans* larvae. The activity level of both bands was greater in adults than in larvae and pupae.

The α -esterase, cholinesterase EST-33, included in the locus 8 was observed in larvae and pupae, exhibiting greater activity in the first than in the second stage. In some strains from *D. prosaltans* and *D. saltans* (P_{BG} , P_E , P_{I60} ,

P_{MS}, S₁ e S₇) a greater activity in pupae, parallel to a slightly greater migration of the band in the gel was observed. This seems to be a variation among individuals.

The α/β -esterase, cholinesterase EST-34, from the locus 9 was observed in larvae and pupae with similar level of activity.

New esterase bands detected in the present study

Five bands that were not detected previously, in the adults, were observed in the present study: EST-LC, EST-LPC, EST-C1, EST-C2 and EST-C3 (Figure 1 and Table 3). All of them were classified as α -esterases. Using Malathion and eserine as inhibitors, two of them were classified as carboxylesterases EST-LC and EST-C1. They were included in new loci we named 3-4 and 7-8, respectively, because these bands are located between the bands from the mentioned loci.

EST-C1, EST-C2 and EST-C3 were exclusively detected in the empty pupal case. EST-C2 and EST-C3 were very thin bands indicating that they are expressed in low level. Besides, EST-C2 was found in few empty pupal cases. EST-C1 showed frequently high degree of activity. Sometimes, it was also detected in pupae with very low degree of activity, but this is probably due to the presence of the case in the pupal analysis. EST-C1 and EST-C3 were detected in the three analyzed species and EST-C2 in *D. saltans* and *D. austrosaltans*.

EST-LPC was shared by larvae, pupae and empty pupal cases from *D. saltans* and *D. prosaltans*. The band EST-LC1 was detected in larvae from *D.*

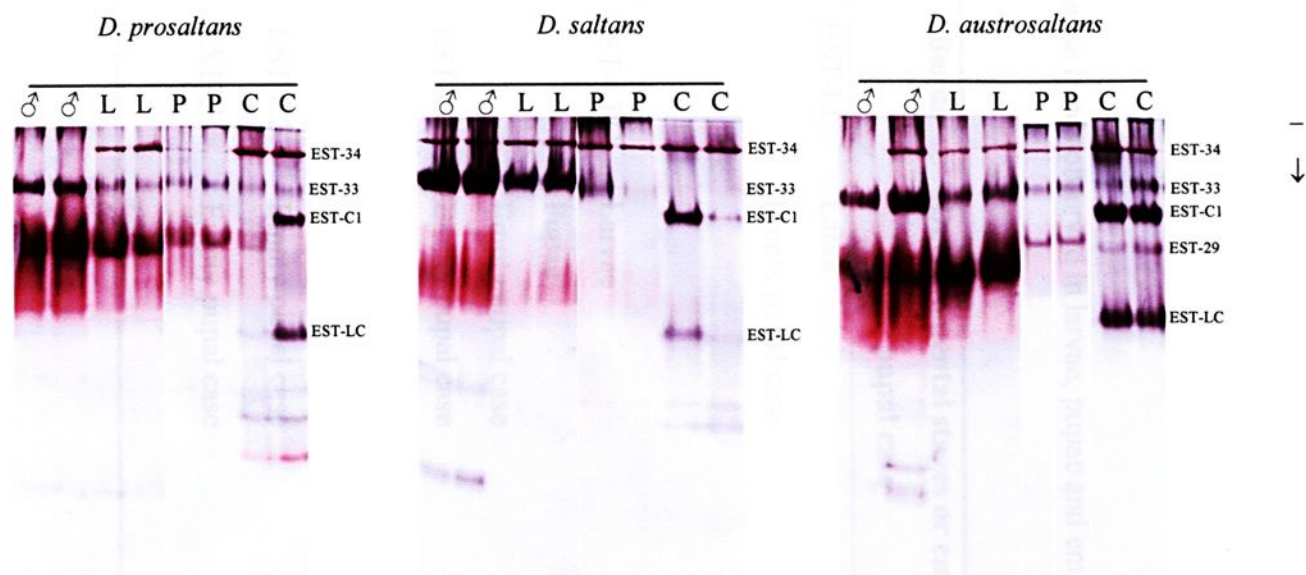


Figure 1. Polyacrylamide gels showing some of the esterase bands detected in larvae (L), pupae (P) and empty pupal cases (C). Two samples, each prepared with two adult males were also included in the gels.

Table 3. New esterase bands observed in larvae, pupae and empty pupal cases.

Locus	Bands	Developmental stages or empty pupal case	Strains
3-4	EST-LC	Larva	P ₅ , S _M
		Empty pupal case	P ₅ , P _{2a} , P _E , P _{I60} , P _{Est} , P _{MS} , P _{BG} , P ₄ , S _{2a} , S ₃ , S ₇ , S _M , S ₁ , Ch, A
7-8	EST-LPC	Larvae	P _{BG} , P _E , S _M
		Pupae	P _{BG} , P _E , P ₄ , S ₁
		Empty pupal case	P ₅ , P _{I60} , S _M
	EST-C1	Empty pupal case	P ₅ , P _{2a} , P _E , P _{I60} , P _{MS} , P _{Est} , P _{BG} , P ₄ , S _{2a} , S ₃ , , S ₇ , S _M , Ch, A
	EST-C2	Empty pupal case	Ch, A
	EST-C3	Empty pupal case	P ₅ , P _{2a} , P _E , P _{MS} , P _{BG} , P ₄ , S _M , S ₁ , S ₃ , S ₇ , Ch, A

prosaltans and *D. saltans* and in empty pupal cases in the three species. The strains in which the bands were detected are mentioned in **Table 3**.

Esterase bands previously detected in adults, larvae or pupae, also observed in empty pupal-cases

Several bands previously observed in adults (Nascimento & Bicudo, 2002) were also observed in the empty pupal cases. They include the bands EST-1, EST-9, EST-10, EST-12, EST-13, EST-14, EST-33 and EST-34. Among them, EST-1, EST-12, EST-13, EST-33 and EST-34 were also observed in larvae and pupae. All of them exhibited a very low degree of expression in the empty pupal case, except EST-34, which showed the same degree of expression detected in larvae, pupae and adults.

Variations of frequency of the band EST-34 in larvae, pupae and adults

Data on the frequency of the band EST-34 in the developmental stages is shown in **Table 4**. The descriptive statistics are in **Table 5**. The analysis of variance for stage comparison ($F=16,87$; $P=0,000 < 0,05$) and the multiple comparison of Tuckey pairwise showed significant differences in the comparison of larvae versus adults, and pupae versus adults ($DMS=0,314$).



Table 4. Frequency of the band EST-34 in larvae and pupae (data from the present study) and in adults (data from Nascimento & Bicudo, 2002), for comparison.

Strains	Larvae	Pupae	Adults
P _{Est}	0.64	0.72	0.15
P _{I60}	0.36	0.36	0.27
P _{BG}	1	1	0.31
P _{MS}	1	0.81	0.31
P _E	0.81	0.90	0.37
P _{2a}	0.18	0.18	0.40
P ₄	1	1	0.22
P ₅	1	1	0.27
A	0.75	1	0.38
S ₁	1	0.36	0.25
S _{2a}	1	1	0.14
S ₃	1	1	0.33
S ₇	0.72	0.72	0.26
S _M	1	1	0.49
Ch	0.11	0.89	0.19

Resumo

Table 5. Descriptive statistics for arcsen(p)^{1/2} transformed data in Table 4. N= number of analyzed samples.

Stages	N	Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
Larvae	15	1.206	0.453	0.338	1.571	1.571
Pupae	15	1.223	0.399	0.438	1.249	1.571
Adults	15	0.5643	0.1085	0.3835	0.5643	0.7754

Discussion

Variation in the esterase activity, detected by gel electrophoresis, has been an important tool in the study of gene action during development. In *Drosophila*, several studies showed patterns of changes of those enzymes, indicating that differential expression of the corresponding genes are part of the developmental program (Paster & Kastriasis, 1971; Sasaki, 1974; Prakash & Reddy, 1978; Sheehan et al., 1979; Oliveira & Cordeiro, 1982; Healy et al., 1991; Karotam & Oakeshott, 1993).

The expression of the genes codifying esterases in adults from four species from the *saltans* subgroup (*saltans* group) were previously studied in polyacrylamide gels by Nascimento & Bicudo (2002). The mentioned species were *D. prosaltans*, *D. saltans*, *D. austrosaltans* and *D. septentriosaltans*. Thirty four bands were detected in them, the corresponding genes being included in nine loci. In the present study, the esterase pattern was studied in larvae, pupae and empty pupal case from the three first mentioned species.

Qualitative and quantitative changes were observed in the development. The first observation was that esterase genes are predominantly expressed in adults. Esterases corresponding to genes included in the loci 2 and 4 were exclusive of that stage. The locus 2 includes eight alleles that codify α -esterases, carboxylesterases, and the locus 4 includes four alleles, codifying β -esterases, carboxylesterases (Nascimento & Bicudo, 2002). In addition, three among the six genes included in the locus 3, which also produces α -esterases, carboxylesterases, were exclusively expressed in adults. The degree of expression of some bands that

were shared between adults and the other stages was also frequently greater in adults. In this case, the best example is the esterase band EST-33, which was detected in 100% of adults by Nascimento & Bicudo (2002) and now was also found in 100% of larvae and pupae.

The present observation of adults showing greater esterase activity, is different from that found in other organisms, such as *Aedes aegypti*, which showed greater activity in larval stages (Lima-Catelani et al., in press). Among *Drosophila* species, *D. rajasekari* showed the maximum activity of bands at pupal stage (Prakash & Reddy, 1978) and *D. virilis*, in adults and early third instar larvae (Sasaki, 1974).

Otherwise, five α -esterase bands detected in the present study were absent in adults. They were named EST-LC, EST-LPC, EST-C1, EST-C2 and EST-C3. As indicated by their symbols, all of them were detected in the empty pupal cases. One of them was also detected in larvae, and another, in larvae and pupae. Three were exclusive of empty pupal cases. The use of inhibitors suggested that two of them (EST-LC and EST-C1) are carboxylesterases. We included these bands in two new loci; EST-LC in a locus that we named 3-4 and EST-C1, in a locus named 7-8, in both cases due to their location in the gels, isolated among biochemically different esterases.

The empty pupal cases also showed bands previously detected in adults. At least seven of these bands exhibited low frequency and expression in the empty pupal case. EST-33 was detected in these structures with low expression, but it was present in every analyzed sample. In pupal cases, EST-33 showed degree of expression lower than that shown by larvae and pupae, which in turn showed

lower degree of expression than adults. Differently, EST-34 exhibited, in the empty pupal cases, high frequency (it was present in most of the analyzed samples) and the same level of expression observed in adults, larvae and pupae.

Another variation found in the development was related to the frequency of flies expressing the band EST-34, in different developmental stages. This band was the only α/β -esterase detected in the *saltans* subgroup (Nascimento & Bicudo, 2002). It showed significantly greater frequency of expression in larvae and pupae than in adults, suggesting a greater physiological involvement in those previous stages.

One observation that is important because it denotes change in the genetic control occurred in the differentiation process of the sibling species studied is that two bands from the locus 3 (EST-12 and EST-13), although present in the adults of the three species were expressed only in larvae and pupae of *D. prosaltans*. The same was true for the EST-15 band, from the same locus, which was exclusively expressed in larval and pupal stages of *D. austrosaltans*. However, it was previously found in adults of the three species.

The esterases are involved in several physiological processes as indicated by literature. Among them, digestion (Argentine & James, 1995), reproduction (Richmond & Senior, 1991), neuron activity (Harel et al., 2000), juvenile hormone metabolism (Gu & Zera, 1994) and insecticide resistance (Feyereisen, 1995).

Frequently, the location of the esterase bands in the body parts is considered indicative of their function (Kambyssellis et al., 1968; Lunday & Farmer, 1982; Arnason & Chambers, 1984). In relation to the esterases detected in

the empty pupal cases, which were also found in larvae and pupae, we could think that they are from possible remainders of their previous content (in spite of the careful cleaning of those structures before the sample preparation). However, three bands were exclusively detected in those structures, indicating that they are really specific of them. What would be their function? The presence of esterase bands in the empty pupal cases was previously mentioned by Berger & Canter (1973, in Ritz, 1997), Oliveira & Cordeiro (1982), Ceron (1988) and Ritz (1997). According with Berger & Canter (above mentioned) the enzymes in the empty pupal cases, which they found also in pupae, could be related to the molting process, more specifically with the digestion of the cuticle. Oliveira & Cordeiro (1982) suggested that the EST-A esterase, present in empty pupal cases of *D. melanogaster* strains is involved with the metabolism of juvenile hormone. The suggestions still need confirmation.

The variation of expression detected in this study reinforces the idea that specific esterases have special physiological role in different stages. Besides, it also showed that the esterases are among the products whose codifying genes were submitted to regulatory changes during the differentiation of the analyzed species, suggesting that these changes can be used to understand the mechanisms underlying the evolutionary process. We believe that the questions that were raised by the present data deserve the continuity of the investigation.



Acknowledgements

Thanks are due to Capes (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) for the fellowship given to A. P. N., to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support and to Dr. Antonio José Manzato for helping in the statistical analysis.



References

- Argentine, J. A. and James, A. A.** (1995). Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **25**(5), 621-630.
- Arnason, E. and Chamber, G. B.** (1984). Substrate specificity of esterase in *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila melanogaster* with notes on tissue localization of estrase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. *Dros. Inf. Serv.* **60**, 52-53.
- Berger, E. M. And Canter, R.** (1973). The esterase of *Drosophila*. I. The anodal esterases and their possible role in eclosion. *Develop. Biol.* **33**, 48-55.
- Bussab, W. O. and Morettin, P. A.** (1985). Estatística básica. 3 rd edition. Atual Editora, São Paulo, 321 pp.
- Campbell, P. M., Robin, G. C. de Q., Court, L. N., Dorrian, S. J., Russell, R. J. and Oakeshott, J. G.** (2003). Developmental expression and gene/enzyme identifications in the alpha esterase gene cluster of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* **12** (5), 459-471.
- Ceron, C. R.** (1988). 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,.
- Ceron, C. R., Santos, J. R And Bicudo, H. E. C.** (1992). The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. *Braz. J. Genet.* **15**(1), 201-203.



- Feyereisen, R.** (1995). Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol. Lett* **82/83**, 83-90.
- Gu, X. and Zera, A. J.** (1994). 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.* **107(4)**, 553-560.
- Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T. L., Mallender, W. D., Lewis, T., Fletcher, R. J., Guss, J. M., Silman, I. and Sussman, J. L.** (2000). Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes. *Protein Science* **9**, 1063-1072.
- Healy, M. J., Dumancic, M. M. And Oakeshott, J. G.** (1991). Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* **29**, 365-388.
- Johnson, F. M., Kanapi, C. G., Richardson, R. H., Wheeler, M. R., Stone, W. S.** (1966). XVIII. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparison. *Univ. Texas Publ.* **6615**, 517-532.
- Kambysellis, M. P., Johnson, F. M. and Richardson, R. H.** (1968). 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.* **1**, 249-265.
- Karotam, J. and Oakeshott, J. G** (1993). Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity*. **71**, 41-50.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.

- Lima-Catelani, A. R., Ceron, C. R. and Bicudo, H. E. M. C.** (20003). Genetic Variation during development, revealed by esterase patterns of *Aedes aegypti* (in press). *Biochemical Genetics*.
- Lunday, A. J. and Farmer, J. L.** (1983). Tissue localization of esterase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. *Biochem. Genet.* **21(5/6)**, 453-463.
- Magalhães, L. E.** (1962). Notes on the taxonomy, morphology and distribution of the *saltans* group of *Drosophila*, with descriptions of four new species. *Univ. Texas Publ.* **6205**, 135-154.
- Nascimento, A. P. and H. E. M. C Bicudo** (2002). Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). *Genetica* **114**, 41-51.
- Oliveira, A. K. and Cordeiro, A. R.** (1982). Genetics of esterase A and its relationship with developmental rate in selected strains of *Drosophila melanogaster*. *Rev. Bras. Biol.* **42(4)**, 725-731.
- Pasteur, N. and Kastritsis, C. D.** (1971). Developmental studies in *Drosophila*. I. Acid phosphatases, esterases and other proteins in organs and whole-fly homogenates during development of *D. pseudoobscura*. *Develop. Biol.* **26**, 525-536.
- Pen, J.; Van Beeumen, J. and Beintema, J. J.** (1986). Structural comparison of two esterases from *Drosophila mojavensis* isolated by immunoaffinity chromatography. *Biochem. J.* **278**, 691-699.
- Prakash, H. S. and Reddy, G. S.** (1978). Variability of alpha & beta esterase activities in the ontogeny of *Drosophila rajasekari*. *Indian Journal of Experimental Biology* **16**, 546-548.



- Richmond, R. C. And Senior, A.** (1991). Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: Kinetics of transfer to females, decay in females and males recovery. *J. Insect Physiol.* **27**, 849-853,.
- Ritz, F. R. C.** (1997). 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 pp.
- Sasaki, F.** (1974). Esterase isozymes of *Drosophila virilis*: developmental aspect of the α - and β -esterases and their distribution in the body parts. *Japan J. Genetics* **49** (4), 223-232.
- Sheehan, k., Richmond, R. C. and Cochrane, B. J.** (1979). Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. III. The developmental pattern and tissue distribution. *Insect Biochem.* **9**, 443-450.
- Steiner, W. W. M. and Johnson, W. C.** (1973). Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. US – IBP. Island Ecosyst. Tech. Rep. **31**, 1-21.
- Zar, J. H.** (1999). Biostatistical analysis. 4 th edition. Prentice Hall, New jersey, 663 pp.



IV. ARTIGO 2

IV. ARTIGO 2

Biological characterization of esterase bands codified by putative homologue genes in three sibling *Drosophila* species from the *saltans* subgroup (*saltans* group)

Adriana Pasqueto Nascimento & Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Key Words: *Drosophila*, expression variation of esterases, organ-specific esterases, species-specific pattern of esterase expression



Resumo

Três bandas esterásicas (EST-5, EST-6 and EST-7) incluídas no loco 2 de três espécies do subgrupo *saltans* (*D. prosaltans*, *D. saltans* and *D. austrosaltans*) foram analisadas quanto ao padrão de expressão nas partes do corpo (cabeça, tórax e abdome) e órgãos (olhos, restos da cabeça após dissecação dos olhos, espermatecas, testículos, ductos digestivos e túbulos de Malpighi). EST-5, específica de *D. prosaltans*, e EST-7, específica de *D. austrosaltans*, expressaram-se exclusivamente na cabeça das fêmeas e na cabeça e abdome dos machos. EST-6, específica de *D. saltans*, foi observada exclusivamente na cabeça de fêmeas e machos. O estudo dos géis para detecção das três bandas, em órgãos, mostrou que EST-5 e EST-6 expressaram-se nos olhos e nos restos da cabeça; EST-7 não pode ser detectada nas amostras analisadas de ambas estruturas. Nos machos, EST-5 e EST-7 foram detectadas nos testículos e nos ductos digestivos, mas apenas EST-5 estava presente nos túbulos de Malpighi. A variabilidade espécie-específica, linhagem-específica e órgão-específica, no padrão de expressão das três enzimas, indica que as mesmas constituem um sistema útil para estudo da evolução da regulação gênica no subgrupo *saltans*.

Abstract

Three esterase bands (EST5, EST-6 and EST-7) included in the locus 2 of the three species of the *saltans* subgroup (*D. prosaltans*, *D. saltans* and *D. austrosaltans*) were analyzed as to their pattern of expression in body parts (head, thorax and abdomen) and organs (eyes, remains of head after dissection of the eyes, spermathecae, testes, digestive ducts and Malpighian tubules). EST-5, specific to *D. prosaltans*, and EST-7, specific to *D. austrosaltans*, were expressed exclusively in the head of females and in the head and abdomen of males. EST-6, specific to *D. saltans* was only present in the head, in males and females. The study of gels for detecting the presence of the three bands, in organs, showed that EST-5 and EST-6 are expressed in the eyes and in the remains of head; EST-7 was absent in the examined samples of both structures. In males, EST-5 and EST-7 were detected in the testes, in the digestive ducts, but only EST-5 was present in Malpighian tubules. The species-specific, strain-specific and organ-specific variability in the pattern of expression of these three esterases indicate that they are an useful system for studying the evolution of the gene regulation in the *saltans* subgroup.

Introduction

Electrophoretic techniques have been extensively used to study enzymatic variations in numerous organisms, for several purposes. Among others, they include studies on genetic differentiation within and among strains and species (Singh & Coulthart, 1982; O'Grady et al., 1998; Del Lama, 2001; Nascimento & Bicudo, 2002), studies on variation of expression during development (Prakash & Reddy, 1978; Healy et al., 1991) and differences of expression in body parts and organs (Sasaki, 1974; Lunday & Farmer, 1983; Sergeev et al., 1993).

The studies on esterase patterns in developmental stages and in body parts and organs are related to the knowledge of the gene expression in the control of biological specificity. They also provide information about the physiological role of the esterases (Kambysellis et al., 1968; Lunday & Farmer, 1983; Sergeev et al., 1993; Lapenta et al., 1995, 1998; Tavares et al., 1998; Del Lama et al., 2001).

Studies in *Drosophila* have shown tissue-specific and stage-specific expression of esterases (Pasteur & Kastiris, 1971; Lunday & Farmer, 1983; East, 1982; Arnason & Chambers, 1984; Karotam & Oakeshott, 1993; Healy et al., 1991). In some cases, esterases have been linked with their correspondent genes. The acetylcholinesterase (Mutero & Fournier, 1992; Harel et al., 2000), the juvenile hormone esterase (Campbell et al., 2001), the esterase EST6 of *Drosophila melanogaster* (Collet et al., 1990) and the EST-5 of *Drosophila pseudoobscura* (King, 1998) are among them.

Species from the *Drosophila saltans* subgroup (*saltans* group) were previously examined as to their esterase patterns (Nascimento & Bicudo, 2002).

Thirty four esterase bands were detected and tentatively included in nine genetic loci. EST-5, EST-6 and EST-7 were among the eight esterase bands included in the locus 2. They were biochemically classified as α -esterases (they hydrolize the substrate α -naphtyl acetate), and as carboxylesterases (they are inhibited by Malathion and not by Eserine). The EST-5 esterase was exclusively detected in *D. prosaltans*, the EST-6 in *D. saltans* and EST-7 in *D. austrosaltans*.

The aim of the present study was to obtain additional information on biological features of the three esterases and to detect differences as to their expression among species in the *saltans* subgroup that could help to understand the mechanisms underlying their evolutionary divergence.

Materials and Methods

Species, strains and esterase bands studied

D. prosaltans (strain P₅, from Bucaramanga, Colômbia), *D. saltans* (strain S₇, from Chilpancingo, México) and *D. austrosaltans* (strain A, from Pirassununga, São Paulo) were used. In the laboratory, they have been maintained in bottles containing cornstarch agar culture medium, at the temperature of 20°C ± 1°C. Flies from the different bottles in the stocks were mixed at intervals of about 3 months, aiming to decrease the inbreeding effects.

The study of the esterase bands EST-5 from (*D. prosaltans*), EST-6 from (*D. saltans*) and EST-7 from (*D. austrosaltans*) involved the detection of their presence in adults and analysis of their degree of expression level in body parts (head, thorax and abdomen) and in organs (digestive duct, espermatheca, testes and Malpighian tubules and eyes isolated from remains of the head).

Electrophoresis

The esterase patterns were studied by electrophoresis in polyacrylamide gels using a 12% separating gel and a 4% stacking gel (Laemmli, 1970). For identification of the esterases, the gels were soaked for 45 min in 50ml 0.1 M sodium phosphate, pH 6.2, at room temperature (~25°C) and placed for one hour in staining solution prepared with 50 ml of the sodium phosphate solution, 15 mg of β -naphthyl acetate, 20 mg of α -naphthyl acetate, 60 mg of Fast Blue RR and 5 ml of N-

propanol (Johnson et al., 1966; Steiner & Johnson, 1973). Electrophoresis was performed for 4.0 h at 25° C, using a constant 200V. The running buffer used was 0.1 M Tris-glycine at pH 8.3. Polyacrylamide gels were air dried at room temperature, as described by Ceron et al. (1992).

Sample preparations

To analyze the presence of the bands in the three body parts (head, thorax and abdomen) and in organs, the flies were dissected in Demerec's solution (Demerec & Kaufmann, 1945). Five ten-day-old adult flies of each sex were used for preparing each sample in the analysis of body parts. For organs, 20 ten-day-old adult flies were used. The body parts were squashed in 20 µl of the buffer solution for each sample preparation. The presence of bands was examined in virgin and crossed flies. The crosses involved virgin seven-day-old females and males that were joined during three days in tubes with food, before sample preparation for gels. As in the study of body parts, the organs were squashed in 20 µl of the buffer solution for each sample.

The total number of flies studied for analysis of the esterase patterns in body parts, organs and controls are in **Table 1**.

Degree of Expression of the bands

The intensity of staining and thickness of bands are considered indicative of the esterase activity degree. In the present study, optical densitometry by image



Table 1. Number of flies used for analysis of body parts and organs. H= Head; Th= Thorax; A= Abdomen; S= Spermatheca; E= Eye; DD= Digestive duct; TM= Malpighian tubule; T= Testes; E= Eyes; RH= remains of head, after eyes dissection. F= Females; M= Males.

	Body parts						Organs										Control		Total
	H	Th	A	H	Th	A	S	E	DD	MT	T	E	DD	MT	E+RH				
	F			M			F				M				F	M	F	M	
Flies	F			M			F				M				F	M	F	M	
Virgin	295			245			120				120				15	15	166	151	1127
Crossed	85			30			-								-	-	28	4	147
Total	380			275			120				120				15	15	194	155	1274

analysis (Program Global Lab Image, Data Translator, 1995) was carried out for evaluation of the degree of activity of the esterase bands EST-5, EST-6 and EST-7, in males and females. In this program, grayscale values range from 255 (absence of staining) to zero (black). Between these limits are found values for moderately and weakly stained bands or, in other words, bands with intermediate and weak activity. This program yields profile graphs whose horizontal axis represents the points along the line segment (bands, in the present case) and the vertical axis represents the pixel value at each point.

Results

Location of the esterase bands EST-5, EST-6 and EST-7 in gels of adult flies and evaluation of their degree of expression in males and females

The esterase patterns of adults of the three species for showing the bands EST-5, EST-6 and EST-7 are presented in a comparative gel in **Figure 1**. The prestained protein ladder (Gibco) indicated that their molecular weight is below 36, perhaps between 30 and 25.

Each of these bands exhibited difference of expression between males and females, denoted by their degree of staining. The evaluation of these differences by image analysis is shown in the profile graphs in **Figure 2**. In this Figure, above each profile graph, a strip containing the bands, cut from the gel used for image analysis, is presented. The degree of activity of the esterases EST-5 (from *D. prosaltans*) and EST-7 (from *D. austrosaltans*) was greater in males than in females. Unlike, the EST-6 band (from *D. saltans*) showed greater activity in females than in males. For EST-5, two profile graphs are presented in Figure 2: one of them from P₅ strain and the other from P_{MS} strain. For EST-5 from P₅, the male mean grayscale value was about 110 and the female one was almost the double, 230. For EST-5 from P_{MS}, the male mean grayscale value was about 47 and the female one was more than three times that value, 170 (remember that, in the computer program used, the greatest grayscale values correspond to the smallest degree of activity). The mean grayscale values were calculated from data

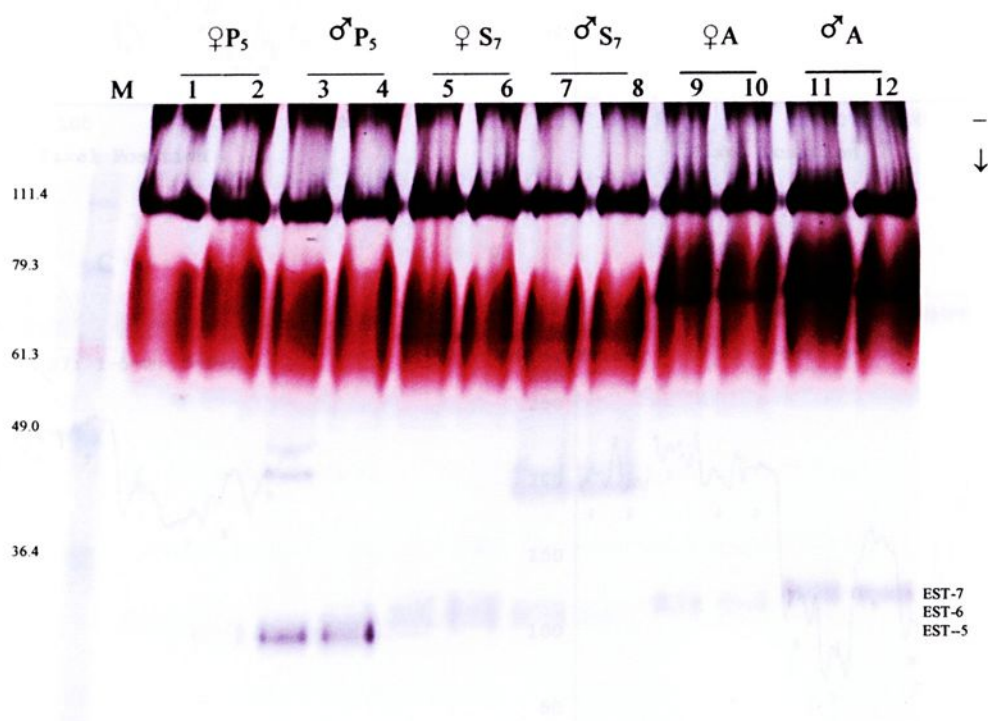


Figure 1. Location of the esterase bands EST-5, EST-6 and EST-7 in a comparative gel of adult males and females. P₅ = *D. prosaltans*; S₇ = *D. saltans*; A = *D. austrosaltans*; M = molecular marker. Numbers indicate the two samples prepared with two flies from each species.

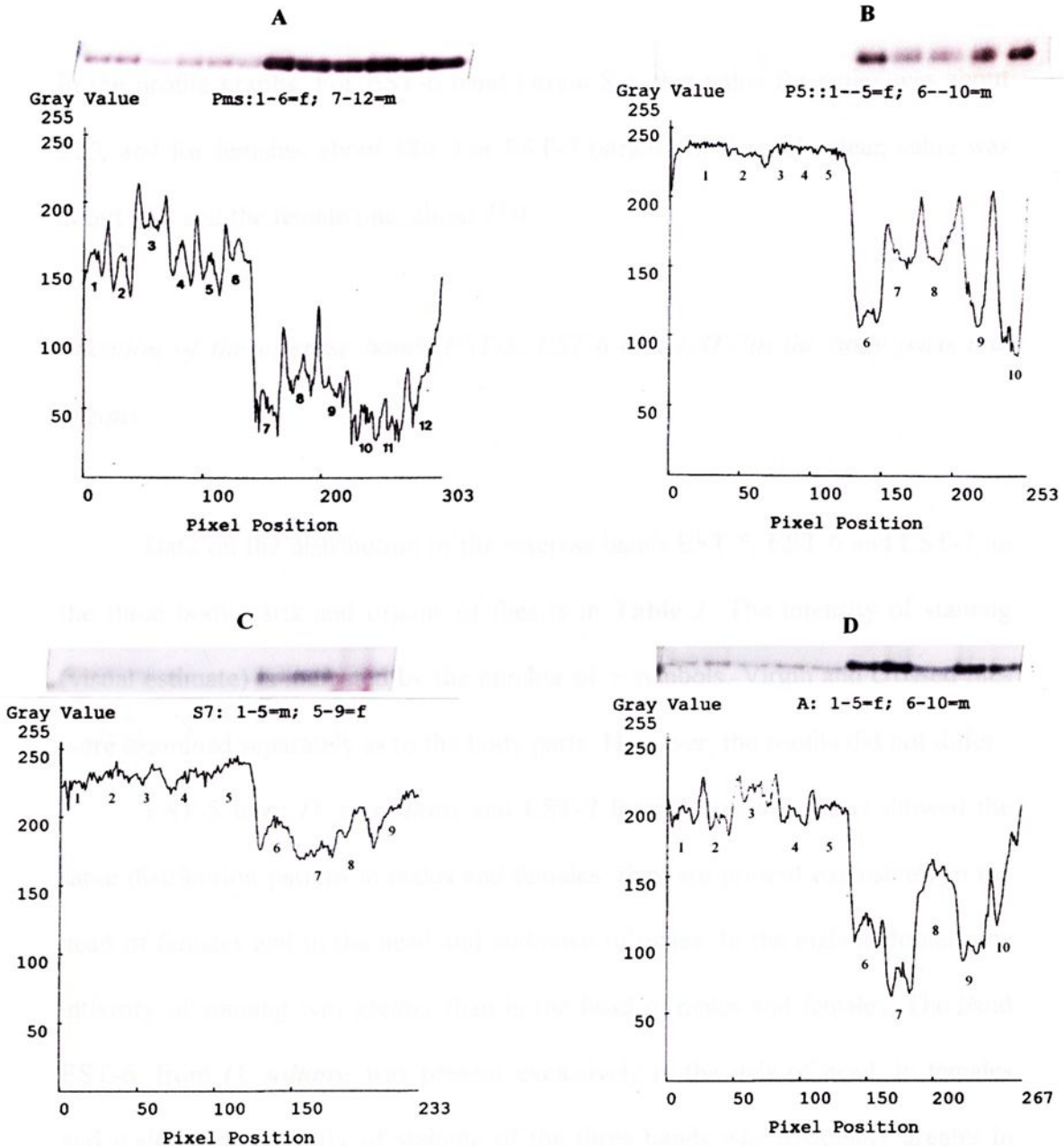


Figure 2 A-D. Evaluation, by image analysis, of the degree of expression of the bands EST-5, EST-6 and EST-7 in males and females of *D. prosaltans*, *D. saltans* and *D. austrosaltans*, respectively. Profile graphs A and B are from *D. prosaltans* different strains (P_{MS} and P_5), and C and D ones are from *D. saltans* (S_7 strain) and *D. austrosaltans* (A strain), respectively. Above each profile graphs is a strip cut from the gel containing the bands used in the image analysis. f=female; m=male. Numbers in the profile graphs indicate sequence of bands in the gel.

in the profile graphs. For EST-6 band (strain S₇), that value for males was about 225, and for females, about 180. For EST-7 (strain A), the male mean value was about 130 and the female one, about 200.

Location of the esterase bands EST-5, EST-6 and EST-7 in the body parts and organs

Data on the distribution of the esterase bands EST-5, EST-6 and EST-7, in the three body parts and organs of flies is in **Table 2**. The intensity of staining (visual estimate) is indicated by the number of + symbols. Virgin and crossed flies were examined separately as to the body parts. However, the results did not differ.

EST-5 from *D. prosaltans* and EST-7 from *D. austrosaltans* showed the same distribution pattern in males and females: they are present exclusively in the head of females and in the head and abdomen of males. In the male abdomen, the intensity of staining was greater than in the head of males and females. The band EST-6, from *D. saltans*, was present exclusively in the gels of head, in females and males. The intensity of staining of the three bands was frequently greater in female heads than in male ones. Gels prepared with the thorax did not show any of the esterases studied (**Figure 3**).

Data on the presence of the three esterase bands in organs, including spermathecae, testes, eyes and remains of head after dissection of eyes, Malpighian tubules and digestive ducts are shown in **Figure 4**. In the eyes, the same distribution pattern was observed for the esterase bands EST-5 and EST-6: they were present in moderate amount in males and females. In the remains of

Table 2. Presence and degree of activity of the EST-5, EST-6 and EST-7 esterases bands, in the body parts and organs dissected from adults of the species *D. prosaltans*, *D. saltans* and *D. austrosaltans*, respectively: H. remains=head remains; D. duct=digestive duct; M. tubules=Malpighian tubule; ----= absence of bands; +, ++, +++=increasing degree of activity the esterases.

Body parts and organs	Esterases and Species					
	EST-5 (P ₅)		EST-6 (S ₇)		EST-7 (A)	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Head	+++	++	+++	++	++	+
Thorax	----	----	----	----	----	----
Abdomen	----	+++	----	----	----	+++
Eye	++	++	++	++	----	----
H. remains	++	++	++	+	----	----
Spermathecae	----		----		----	
Teste		++		----		++
D. duct	----	++	----	----	----	++
M. tubule	----	+	----	----	----	----

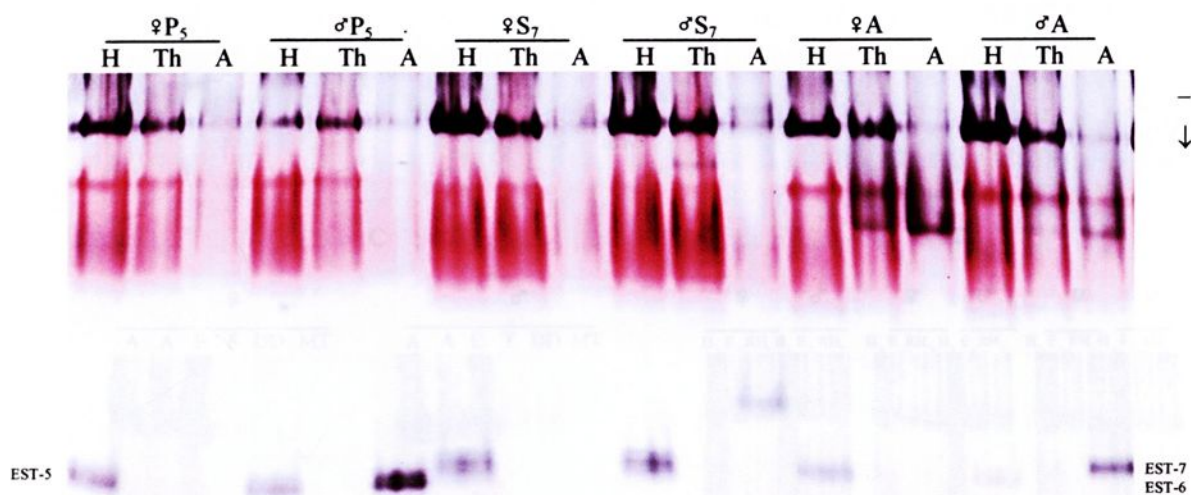


Figure 3. Distribution of the esterases EST-5, EST-6 and EST-7 in the body parts of males and females from the three species. *D. prosaltans* (strain P₅), *D. saltans* (strain S₇) and *D. austrosaltans* (strain A), H=head; Th=thorax; A=abdomen.

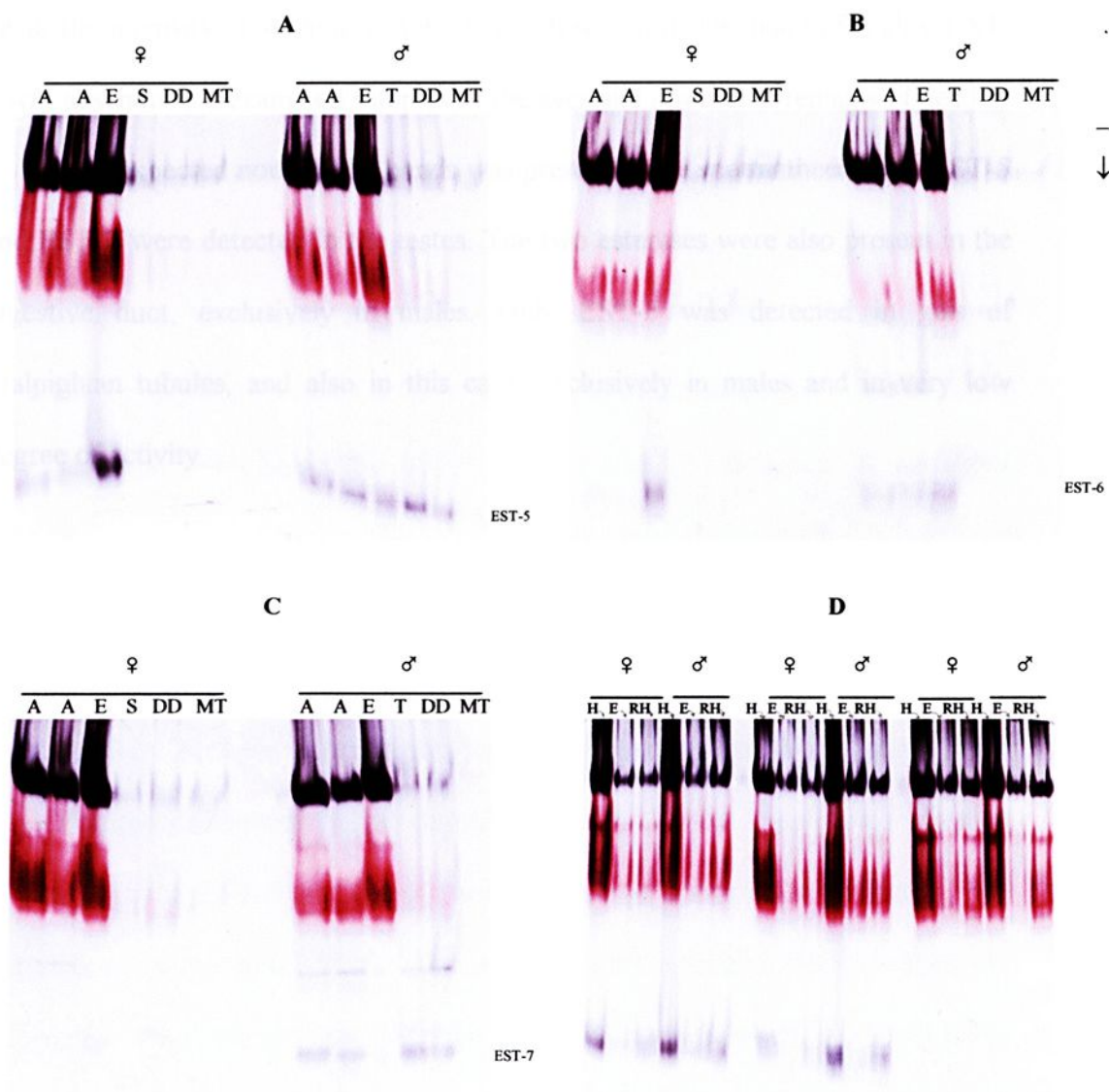


Figure 4 A – D. (A –C) Distribution of the esterases EST-5, EST-6 and EST-7 in organs separately in *D. prosaltans* (A), in *D. saltans* (B) and in *D. austrosaltans* (C). (D) Distribution of the esterases in head (H), eye (E) and head remains (RH) of males and females from the species *D. prosaltans*, *D. saltans* and *D. austrosaltans*, in the sequence. A=adults, E=eyes, S=spermathecae, T= teste, DD=digestive duct, MT=Malpighian tubules.

head, the intensity of staining of EST-6 was lower in males than in females. EST-7 was absent in the examined samples of the eyes and also in the remains of head.

As expected none of the bands was present in the spermathecae, but EST-5 and EST-7 were detected in the testes. The two esterases were also present in the digestive duct, exclusively in males. Only EST-5 was detected in gels of Malpighian tubules, and also in this case, exclusively in males and in very low degree of activity.

Discussion

Among the nine loci tentatively established by Nascimento & Bicudo (2002) for the genes codifying the esterase bands of four species in the *saltans* subgroup, the locus two was the most polymorphic. Eight esterase bands classified by the same authors as α -esterases and carboxilesterases were included in it, three of them being the EST-5, EST-6 and EST-7 bands. These bands migrate in the gel in close positions, the sequence of their numbering following the sequence of their position, from the less anodic to the more anodic ends of the gel. In addition to their differences in migration pattern (which denotes changes in charge and molecular weight), these bands were characteristic of different species and exhibited differences in the degree of activity between males and females. The activity of EST-5 and EST-7 was greater in males than in females, the opposite occurring with EST-6. These features were indicative that increasing the knowledge about the changes that involved these esterase bands, we could know more about the mechanisms underlying the evolutionary divergence of the three species.

Data obtained in the present work showed that, in addition to the differences between EST-5, EST-6 and EST-7 esterases, previously described, there are others related to their expression in the body parts and organs, suggesting changes in their physiological role.

As mentioned, in the previous study (Nascimento & Bicudo, 2002), the EST-5 and EST-7 esterases, which were expressed in *D. prosaltans* and *D. austrosaltans*, respectively, showed higher degree of activity in males than in

females. When parts of the body and organs were examined, both esterases were detected exclusively in the head of females and in the head and abdomen of males. However, the two esterases differed from each other as to the degree of activity in body parts: in the abdomen of males their expression was high, but EST-7, from *D. austrosaltans*, showed much lower degree of activity in the head, mainly in males, than EST-5 in the head of both sexes from *D. prosaltans* flies.

The analysis of two strains from *D. prosaltans* indicated that, even among strains, some difference in the esterase expression is possible. Although maintaining the pattern that characterizes EST-5, the degree of expression was lower or higher in both sexes, in those strains.

The analysis of organs showed other differences between EST-5 and EST-7. In the eyes, which were examined separately from the remains of the head, EST-5 was detected in both structures, but EST-7, which had exhibited low activity in the entire head, was not detected when the heads were separated in the two parts, even in the samples prepared with 20 dissected heads. The analysis of the male abdominal organs showed another difference between EST-5 and EST-7: both esterases were detected in testes and digestive ducts of their respective species, but only EST-5 was expressed in the Malpighian tubules.

As to the esterase EST-6, exclusive of *D. saltans*, the analysis of the body parts showed that it is expressed exclusively in the head of females and males, with difference of expression between sexes (greater in the females than in the males). EST-6 was expressed in the eyes and in the remains of head, but in the gels of males the enzyme was very light in both parts, while in females, its expression was higher, mainly in the remains of the head.

The literature includes several studies on tissue distribution of esterases in *Drosophila*. However, the esterase function remains speculative in most cases, only suggested by their presence in certain tissues. Among the best known esterases are the β -esterases 6 from *D. melanogaster* (Richmond *et al.*, 1980) and 5 from *D. pseudoobscura* (Arnason, 1982). The function of esterase 6, from *D. melanogaster* is related to reproduction. This enzyme was detected in the sperm ejaculatory duct, being transferred to the females during the copula; it hydrolyses the cis-vaccenil acetate in females and the product is an inhibitor of new copula during some time (Mane *et al.*, 1983). Est-5 from *D. pseudoobscura* is present in the eyes and absent in whole abdomens (Lunday & Farmer, 1983; Arnason & Chambers, 1984). Arnason & Chambers (1984) considered that the data on esterase 5 from *D. pseudoobscura* and 6 from *D. melanogaster* support the model of homology between them, but their tissue localization clearly demonstrates that their loci are now under different forms of developmental regulation. In transformed *D. melanogaster*, four independently acting *Est-6* regulatory regions that direct the expression of β -galactosidase gene in different organs, were detected (Ludwig *et al.*, 1993).

As Ludwig *et al.* (1993) mentioned in relation to the locus of esterase 6-gene of *D. melanogaster* and related species, we also consider that the species-specific and organ-specific variability in the pattern of expression and the variability in the level of expression among strains make the three esterases an useful system for studying the evolution of gene regulation in the *saltans* subgroup. In addition, we consider that the present data provide useful information as to the phylogenetic relationships among the analyzed species.

Data on the expression of esterases in body parts and organs supports the evolutionary relationships among *D. prosaltans*, *D. saltans* and *D. austrosaltans* based on chromosomal polymorphism (Bicudo, 1973b) and on esterase patterns (Nascimento & Bicudo, 2002). The expression of EST-5 in *Drosophila prosaltans*, which is considered the stem species in the *saltans* subgroup (Throckmorton & Magalhães, 1962; Bicudo, 1973b), is similar to the distribution of EST-7, from *D. austrosaltans*, which is considered intermediate between *D. prosaltans* and *D. saltans* in the above mentioned phylogenetic relationships. *Drosophila saltans* that was considered the most derivative among the three species analyzed in the present work, presents a more differentiated and restrict expression of the EST-6.

If on the one hand, the information in the present study reinforces the previous idea that the three bands are codified by alleles from the same locus, which were submitted to modifications in the process of species divergence, on the other hand, many problems were raised which remain to be solved. Besides those of molecular nature, mainly related to what kind of genetic changes occurred, there are those of physiological nature. For example, how to explain physiologically the presence of the enzymes EST-5 and EST-7 only in the head of females? Why are they not necessary for function of abdominal organs as observed in males? Although the presence of these enzymes was not restricted to testes, crossed and virgin flies were analyzed separately in order to look for differences that could suggest involvement with reproduction, but, in both situations the level of expression of the two esterases was apparently the same.

Another question is related to EST-6. Why is it only present in the head of males and females, and why its expression is higher in females than in males?

Certainly many studies will be still necessary for better knowledge of these esterases. Our next step will be to try to sequence them and to look for their codifying genes.



Acknowledgements

Thanks are due to CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) for a fellowship given to A. P. N. and to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support.



References

- ARNASON, E., 1982. An experimental study of neutrality at the malic dehydrogenase and esterase-5 loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Hereditas*, 96:13-27.
- ARNASON, E. & G. B CHAMBER, 1984. Substrate specificity of esterase in *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila melanogaster* with notes on tissue localization of esterase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. *Dros. Inf. Serv.* 60: 52-53.
- BICUDO, H. E. M. C., 1973 b. Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*. I. The *saltans* subgroup. *Genetica* 24: 520-552.
- CAMPBELL, P. M., R. L. HARCOURT, E. J. CRONE , C. CLAUDIANOS, B. D. HAMMOCK, R. J. RUSSELL & J. G. OAKESHOTT, 2001. Identification of a juvenile hormone esterase gene by matching its peptide mass fingerprinting with a sequence from the *Drosophila* genome project. *Insect Biochem Molec Biol* 31: 513-520.
- CERON, C. R., J. R SANTOS & H. E. C. BICUDO, 1992. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. *Braz. J. Genet.* 15(1): 201-203.
- COLLET, C., K. M. NIELSEN, R. J. RUSSELL & M. KARL, 1990. Molecular analysis of duplicated esterase genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 7(1): 9-28.



- DEL LAMA, M. A., R. M. BEZERRA, A. E. E. SOARES & M. C. RÚVULO-TAKASUSUKI, 2001. Genetic, ontogenetic, and tissue-specific variation of aminopeptidases of *Apis mellifera*. *Apidologie* 32: 25-35.
- DEMEREK, M. & B. P. KAUFMANN, 1945. *Drosophila* guide. The Lord Baltimore Press, Baltimore, Maryland.
- EAST, P. D. Non-specific esterases of *Drosophila buzzatii*. In: BARKER, I. S. F., STAMER, W. T. (Ed.), 1982. Ecological Genetics and Evolution. The cactus-yeast *Drosophila* Model System. Sidney: Academic Press, Australia, 323-338.
- HAREL, M., G. KRYGER, T. L. ROSENBERRY, W. D. MALLENDER, T. LEWIS, R. J. FLETCHER, J. M. GUSS, I. SILMAN & J. L. SUSSMAN. 2000. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes. *Protein Science* 9:1063-1072.
- HEALY, M. J., M. M. DUMANCIC & J. G. OAKESHOT, 1991. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 29: 365-388.
- JOHNSON, F. M., KANAPI, C. G., RICHARDSON, R. H., WHEELER, M. R., STONE, W. S., 1966. XVIII. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparison. *Univ. Texas Publ.* 6615: 517-532.
- KAMBYSELLIS, M. P., F. M. JOHNSON & R. H. RICHARDSON, 1968. 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.* 1: 249-265.

- KAROTAN, J. & J. G OAKESHOTT, 1993. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity*. 71: 41-50.
- KING, L. M. 1998. The role of gene conversion in determining sequence variation and divergence in the Est-5 gene family in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 148: 305-316.
- LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- LAPENTA, A. S., H. E. M. C. BICUDO & C. R CERON, 1995. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios* 84: 13-29.
- LAPENTA, A. S., H. E. M. C. BICUDO, C. R. CERON & A. J CORDEIRO, 1998. Esterase patterns and phylogenetic relationships of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios* 96: 95-107.
- LUDWIG, M. Z., N. A. TAMARINA & R. C. RICHMOND, 1993. Localization of sequences controlling the spatial, temporal, and sex-specific expression of the esterase 6 locus in *Drosophila melanogaster* adults. *Procl. Natl. Acad.* 90: 6233-6237.
- LUNDAY, A. J. & J. L FARMER, 1983. Tissue localization of esterase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. *Biochem. Genet.* 21 (5/6): 453-463.
- MANE, S. D., L. TOMPKINS & R. C RICHMOND, 1983. Male esterase 6 catalyses the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster* females. *Science* 222: 419-421.
- MUTERO, A. & D. FOURNIER, 1992. Pos-translational modifications of *Drosophila acetylcholinesterase*, in vitro mutagenesis and expression in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 267 (3): 1695-1700.

- NASCIMENTO, A. P. & H. E. M. C BICUDO, 2002. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). *Genetica* 114: 41-51,.
- O'GRADY, M. P., J. B. CLARK & M. G. KIDWELL, 1998. Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 15 (6): 656-664.
- PASTEUR, N. & C. D. KASTRITSIS, 1971. Developmental studies in *Drosophila*. I. Acid phosphatases, esterases and other proteins in organs and whole-fly homogenates during development of *D. pseudoobscura*. *Develop. Biol.* 26: 525-536.
- PRAKASH, H. S. & G. S. REDDY, 1978. Variability of alpha & beta esterase activities in the ontogeny of *Drosophila rajasekari*. *Indian Journal of Experimental Biology* 16: 546-548.
- RICHMOND, R. C., D. G. GILBERT, K. B. SHEEHAN, M. H. GROMKO & F. M. BUTTERWORTH, 1980. Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Science* 207: 1483-1485
- SASAKI, F., 1974. Esterase isozymes of *Drosophila virilis*: developmental aspect of the α - and β -esterases and their distribution in the body parts. *Japan J. genetics* 49 (4): 223-232.
- SERGEEV, P. V., V. M. PANIN, G. V. PAVLOVA, M. R. KOPANTSEVA, N. G. SHOSTAK, V. N. BASHKIROV, G. P. GEORGIEV & L. KOROCHKIN, 1995. I. The expression of esterase S of *Drosophila virilis* in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters* 360: 194-196.

- SINGH, R. S. & M. B. COULTHART, 1982. Genetic variation in abundant soluble proteins of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 102: 437-453.
- STEINER, W. W. M. & W. C JOHNSON, 1973. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. US – IBP. Island Ecosyst. Tech. Rep. 31: 1-21.
- TAVARES, M. G., M. T. V. AZEREDO-OLIVEIRA & C. R. CERON, 1998. Tissue-specific expression of esterases in *Triatoma infestans* (Triatoma, Heteroptera). *Genetics and Molecular Biology* 21 (4): 461-464.
- THROCKMORTON, L. H., MAGALHÃES, L. E. Research Reports on *Drosophila* Genetics, Taxonomy and Evolution, 1962. XVI. Changes with evolution of pteridine accumulations in species of the *saltans* group of genus *Drosophila*. *Genetics* 6205: 489-504.

V. ARTIGO 3

ARTIGO 2

Artigo 2º - O presente Regulamento estabelece as normas para a realização das atividades de ensino, pesquisa e extensão, bem como para a organização e funcionamento dos cursos de graduação, pós-graduação e extensão, de acordo com as diretrizes estabelecidas no Plano de Desenvolvimento Institucional (PDI) e no Regulamento Geral de Ensino, Pesquisa e Extensão (RGEPE).

Artigo 3º - O presente Regulamento estabelece as normas para a organização e funcionamento dos cursos de graduação, pós-graduação e extensão, de acordo com as diretrizes estabelecidas no Plano de Desenvolvimento Institucional (PDI) e no Regulamento Geral de Ensino, Pesquisa e Extensão (RGEPE).

Artigo 4º - O presente Regulamento estabelece as normas para a organização e funcionamento dos cursos de graduação, pós-graduação e extensão, de acordo com as diretrizes estabelecidas no Plano de Desenvolvimento Institucional (PDI) e no Regulamento Geral de Ensino, Pesquisa e Extensão (RGEPE).

V. ARTIGO 3

V. ARTIGO 3

Biological and molecular characterization of the EST-33 esterase, an enolase in *Drosophila austrosaltans* (saltans group, saltans subgroup)

Adriana Pasqueto Nascimento & Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

Key words: esterase, neuron-specific enolase, *Drosophila austrosaltans*



Resumo

O presente estudo sobre a banda esterásica EST-33, uma α -esterase, colinesterase de *D. austrosaltans*, mostrou que esta enzima é produzida nas larvas, pupas e adultos, sendo fortemente expressa nos olhos, nos restos da cabeça após dissecação dos olhos, e no tórax. Dados de estudos realizados em nosso laboratório mostraram que esta banda esterásica foi conservada durante a evolução do grupo *saltans* e, provavelmente do próprio subgênero *Sophophora*, sugerindo que ela desempenha uma função similar e importante nestes organismos. A caracterização bioquímica e o padrão de expressão indicaram que a banda EST-33 está ativa durante todo o desenvolvimento e que ela está envolvida, preferencialmente, na atividade do sistema nervoso. O sequenciamento da proteína extraída da banda usando espectrometria de massa, seguida pela busca da homologia de sequência, mostrou maior identidade de aminoácidos com a enolase de *D. pseudoobscura*. As observações são consistentes com a idéia de que a enolase de *D. austrosaltans* corresponde à γ -enolase de vertebrados superiores, a qual, entre os três tipos descritos de enolase, é neurônio-específica, estando presente no cérebro, retina, tecido nervoso periférico e glândulas neuroendócrinas. A existência de uma enolase neurônio-específica em espécies de *Drosophila* possibilita que este organismo seja usado, mais uma vez, para esclarecer aspectos fisiológicos importantes, agora relacionados à função desta enzima.



Abstract

The present study on the esterase band EST-33, an α -esterase, cholinesterase from *Drosophila austrosaltans*, showed that this enzyme is produced in larvae, pupae and adults, being strongly expressed in the eyes, in the remains of the head after dissection of the eyes, and in the thorax. Data from studies performed in our laboratory has shown that this esterase band was conserved throughout the evolution of the saltans group (probably in the *Sophophora* subgenus), suggesting that it serves a similar and important function in those organisms. The biochemical characterization and the pattern of expression indicated that the band EST-33 is active throughout the entire development, and that it is preferentially involved in nervous system activity. The analysis of the protein extracted from the band using mass spectrometry followed by sequence homology search showed greatest amino acid identity with *Drosophila pseudoobscura* enolase. The observations are consistent with correspondence of the *D. austrosaltans* enolase to the γ -enolase from higher vertebrates which, among the three described types of enolase, is the one neuron-specific, being present in the brain, retina, peripheral nervous tissue and neuroendocrine glands. The existence of a neuron-specific enolase in *Drosophila* species enables this convenient organism to be used once more for clarifying important physiological aspects, now related to this enzyme function.



Introduction

Nascimento & Bicudo (2002) described the esterase patterns of sixteen strains from four species in the saltans subgroup. Among the 34 esterase bands detected in adults, EST-33 (*Est33*, locus 8) was remarkable because it was present in every sample from all strains of the four analyzed species. Besides, it was the esterase with the greatest degree of activity as indicated by thickness and staining in the gels. Nascimento & Bicudo (2002) classified the EST-33 biochemically as an α -esterase included in the group of cholinesterases. The constant presence, the high degree of activity and the conservation in the evolutionary process that gave rise to the species in the saltans subgroup, indicate strongly that EST-33 is a very physiologically important enzyme. Because of this, in the present study we intended to better characterize it, studying its expression in body parts and organs, and during development. Molecular analysis for finding the amino acid sequence identity was also carried out with the aim of identifying EST-33 protein.

Materials and Methods

Species used

The esterase EST-33 was analyzed in *Drosophila austrosaltans* (strain A, Pirassununga, SP-Brazil, *saltans* group *Sophophora* subgenus), which had been maintained in bottles containing corn starch-agar culture medium, at a temperature of $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The bottles in the stocks were mixed at intervals of about 3 months aiming to decrease the effects of inbreeding.

Preparations for analysis of Est-33 expression in body parts and organs

The flies were dissected in Demerec physiological solution (Demerec & Kaufmann, 1945). The body parts (head, thorax and abdomen) were taken from five ten-day-old adult male and female flies and squashed separately to prepare the samples for electrophoresis. The eyes and the remains of the heads after dissection of the eyes, testicles, Malpighian tubules, digestive tracts and spermatecae, taken from 20 ten-day-old adult male and female flies were used to prepare the samples for organ analysis.

Preparations for analysis of Est-33 expression during development

Third instar larvae and pupae were used to study EST-33 in the development of *D. austrosaltans*. For sample preparations, three larvae and two pupae were squashed. The adult stage had already been studied by Nascimento &

Bicudo (2002). However, in the present study, adults were also included in the gels for control.

The parts of the body, the organs and the larvae and pupae were squashed in 20 μ l of the sample buffer solution. 10 μ l for each sample were used in the gels.

Electrophoresis

The presence and the degree of activity of the band were observed in polyacrylamide gels using 12% separating gel and 4% stacking gel (Laemmli, 1970). In order to identify the esterases, the gels were soaked for 45 min in 50 ml 0.1 M sodium phosphate, pH 6.2, at room temperature ($\sim 25^\circ$), placed for 45 min. in a staining solution prepared with 50 ml of the sodium phosphate solution, 15 mg of β -naphthyl acetate, 20 mg of α -naphthyl acetate, 60 mg of Fast Blue RR and 5 ml of N-propanol (Johnson et al., 1966; Steiner & Johnson, 1973).

α and β -naphthyl acetates were used as substrates. The α -esterases use the α -naphthyl acetate and are stained black. The β -esterases hydrolyses the β -naphthyl acetate and are stained red. The esterases that hydrolyze the α as well the β -naphthyl acetates are stained magenta and are named α/β -esterases (Johnson et al., 1966).

The degree of staining is considered to be an indication of the level of esterase activity. In the present study the analysis of the degree of activity involved the evaluation of the degree of staining of the EST-33 esterase band in body parts, organs and development, using optical densitometry by image analysis (Program Global Lab Image, Data Translator, 1995). In the program, grayscale



values range from 255 (absence of staining) to zero (black). Between these limits are found values for moderately and weakly stained bands or, in other words, bands with moderate and weak activity. This program yields profile graphs whose horizontal axis represents the points (bands in the present case) along the line segment and the vertical axis represents the pixel value at each point.

Protein Purification

The esterase was isolated from the gel by the Townson technique (1972), with modifications. Forty male *D. autrosaltans* were used to obtain the necessary amount of the EST-33 enzyme. They were macerated in 1 ml of the sample buffer and totally applied in a gel without separation wells and submitted to electrophoresis for about 4 hours at 200 V.

After the run, two vertical ribbons of approximately 3 cm were cut, on each side of the gel. The three parts were incubated in phosphate buffer pH 6.2, for 45 min. The two lateral ribbons were removed from the buffer and placed in the specific staining solution for esterases. After staining, the three parts of the gel were placed side by side again, on a glass plate, to determine the position of the band in the central part, which remained unstained. A horizontal strip, corresponding to the part containing the enzyme as indicated by its position on the lateral strips, was removed. This strip was divided in six, 2cm size pieces and each one was placed into an eppendorf containing phosphate buffer pH 6.2 and β -mercaptoethanol, where they were carefully macerated. Then they were centrifuged for 5 minutes at 2000 rpm.



The protein thus extracted was applied in SDS-PAGE gel prepared according to Laemmli (1970), using a 12% separating gel and a 4% stacking gel. The KDA protein ladder used as a molecular weight marker was from Gibco BRL. The gel was stained with Comassie Brilliant Blue R-250 and destained with 25% ethanol and 8% acetic acid. The band was carefully cut from the gel. For the sequencing and characterization of the protein, the services of the Center of Protein Studies (Faculdade de Medicina -USP, Ribeirão Preto-SP) were used.

Enzymatic digestion

In the present study, the samples contained in the gel were submitted to digestion *in situ* with trypsin (Stone et al., 1997). The band contained in the gel was washed four times with NH_4HCO_3 50mM solution in 50% acetonitrile (ACN) (for removing SDS). After these steps, the gel was completely dried by speedvac and re-hydrated with 30 μl of solution containing 0.5 μg trypsin in NH_4HCO_3 200 mM solution (2.5 μl of 0.2 mg/ml trypsin plus 28 μl of buffer NH_4HCO_3 200 mM). After band re-hydration (10min), 200 μl of NH_4HCO_3 200 mM were added to cover the gel. The reaction was maintained at 37°C for 48 hours. 10 μl of 10% formic acid was added to interrupt the reaction. After one hour, the supernatant was saved and the solution containing the peptides was submitted in "tip C18" (C18 resin packed in a pipette tip). The resin was first washed with 100 μl methanol and balanced soon after with 100 μl 0.2% formic acid applied three times. The sample was eluted from the resin with 50 μl of 0.2% formic acid in 70% methanol and submitted to mass espectrometry.

Mass Spectrometry

In the present study, electrospray mass spectrometry was used to identify the EST-33 after the process of digestion *in situ*. Ionization electrospray mass spectrometry uses liquid samples for analysis. The acid solution containing the sample was transformed into spray in an area with a high electric field (approximately 4000V). The generated ions were addressed to the analyzer, where a system of filters performs the separation and takes the ion to the detector. Due to the ionization method, multi-charged molecules are generally formed. This characteristic of electrospray ionization is of great importance, since the method measures the ratio between mass and charge (m/z), making it possible to analyze molecules of high molecular mass in apparatus with a short detection band (Siuzdak, 1996).

The application in the ESI-MS/MS Quattro II (Micromass) mass spectrometer was carried out through the direct infusion of the solution containing the sample, using a syringe pump (100 μ l syringe). Solutions containing from 2 to 0.2 pmol/ μ l of sample were infused in a flow of 20 μ l/h (333 nl/min), in an ionization probe of the Nanoflow type (Micromass). The spectra were collected in periods of 2 minutes (~10 scans/min), combined and processed by the MassLynk program (Micromass).



Sequence determination

The identification of the protein was carried out by mass fingerprint and peptide sequencing by CID-collision induced dissociation (MS/MS). The mass fingerprint is the mapping of peptide masses generated by enzymatic hydrolysis and the comparison with estimated masses for the peptides produced from virtually hydrolyzed protein, available in the databases (Patterson, 2000).

In the present study the amino acid sequence was submitted to the FASTS database (<http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/cgi/searchx.cgi?pgm=fs>). This data bank searches for small and disordered peptides inside the sequences of complete proteins.

Results

Est-33 expression in the body parts and organs

PO/AFGLT

The EST-33 band was present in the gels of the three body parts examined (head, thorax and abdomen), but the greatest degree of activity was observed in the head and thorax. The results were the same for males and females (**Figure 1A**). Using image analysis for evaluating the amount of staining in the band, the profile graph in **Figure 2A** was obtained. Among the organs examined (eyes, remains of the head after dissection of the eyes, spermatecae, testicles, digestive ducts and Malpighian tubules), the eyes and remains of the head showed very intense band activity, while in the other organs it was very light, in males and females (**Figure 1B, C**). The profile graphs are in **Figure 2B, C**.

Developmental expression of Est-33

The analysis of the degree of activity of the EST-33 band during development showed that it is greater in the adults than in larvae and pupae (**Figure 1D**). The profile graph showing this activity difference in the developmental stages is presented in **Figure 2D**.

SDS-PAGE and amino acid analysis

Figure 3 shows the components of the protein from band EST-33 separated by electrophoresis on 12% separating and 4% stacking SDS-

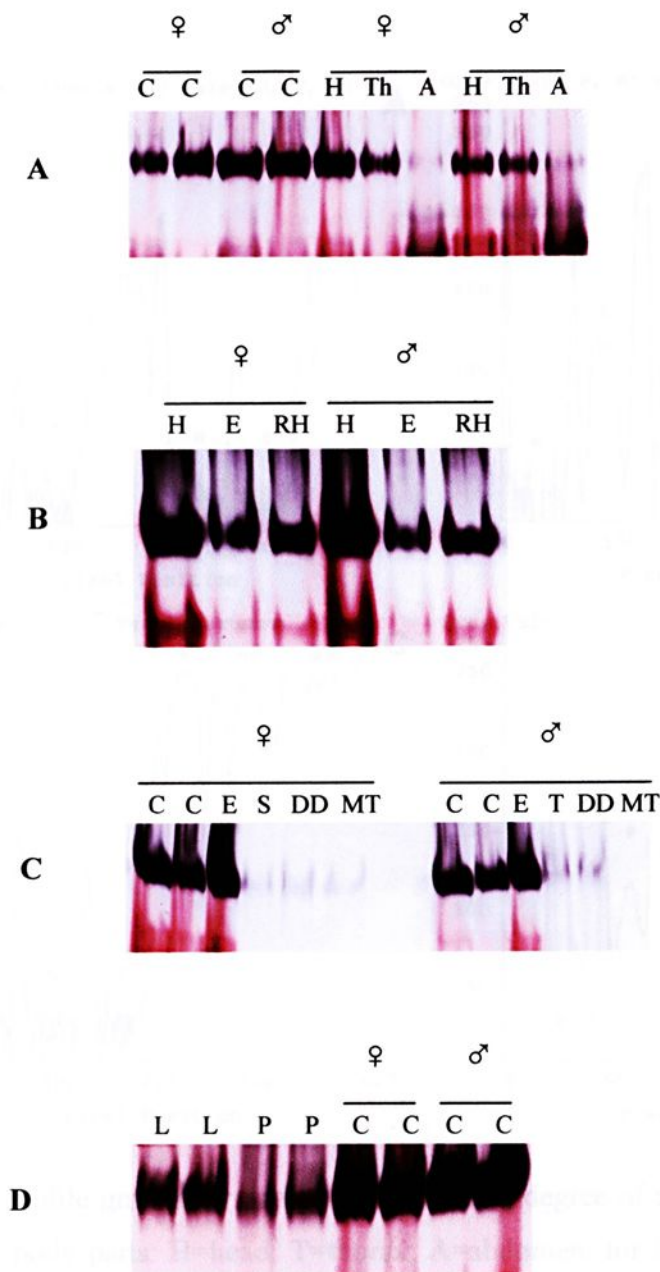


Figure 1 A-D. *Est-33* expression in body parts (A), organs (B, C) and in developmental stages (D) of *D. austrosaltans*. Symbols in A: C=control adult females and males; H=head; Th=thorax; A=abdomen, in B: H= head; E=eyes; RH=remains of the head after dissection of the eyes; in C: C=control adult; E= eyes; S=spermathecae; DD=digestive ducts; MT=Maipighian tubules; in D: L=larvae; P=pupae; C=control adults.



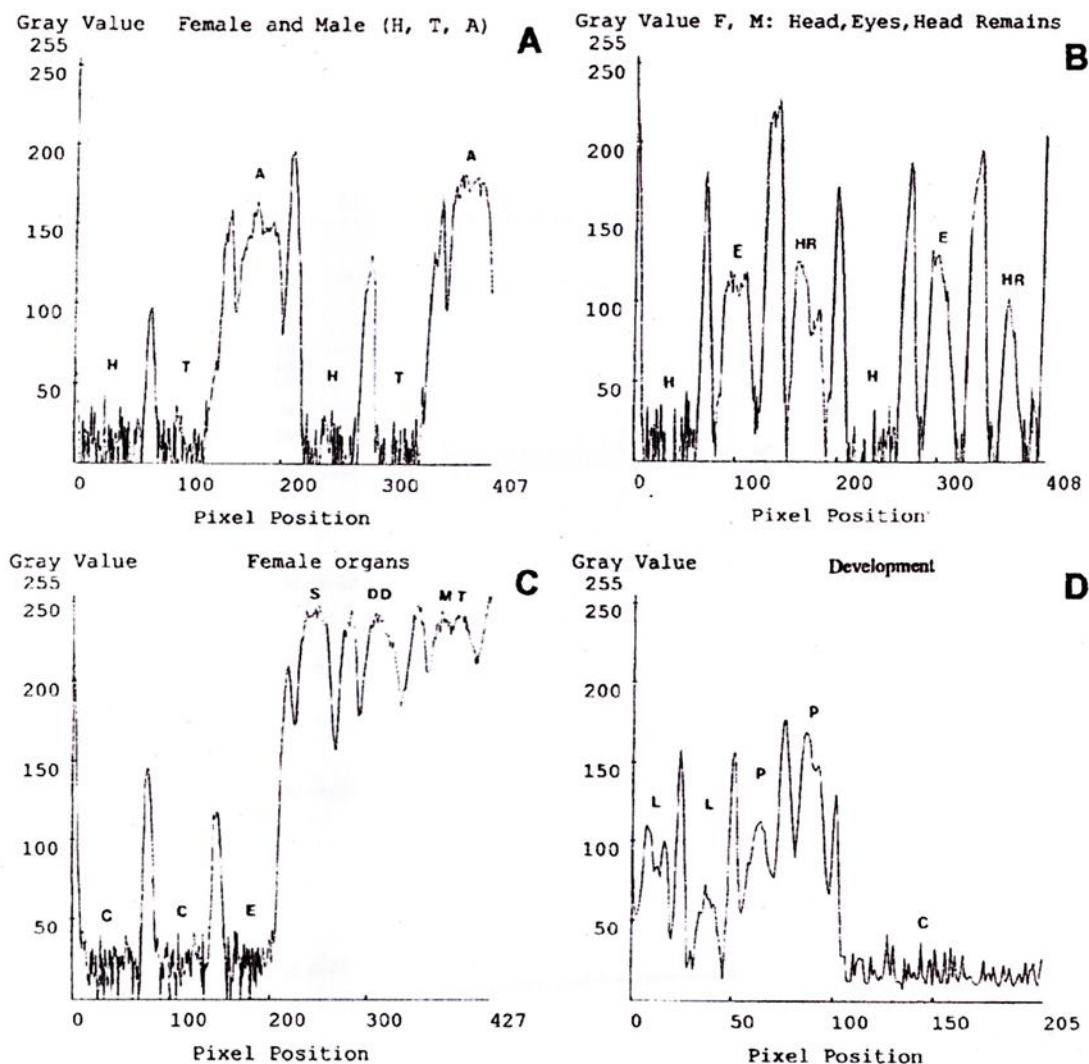


Figure 2 A-D. Profile graphs for analysis of band and degree of activity. A=expression in body parts: H=head; T=thorax; A=abdomen, for females and males in the sequence; B and C=expression in organs: H= head; E=eyes; RH=remains of the head after dissection of the eyes, for males and females in the sequence; C= control adult; E= eyes; S=spermathecae; DD=digestive ducts; MT=Malpighian tubules; in females; D= expression during development: L=larvae; P=pupae; C=control adults females and males.

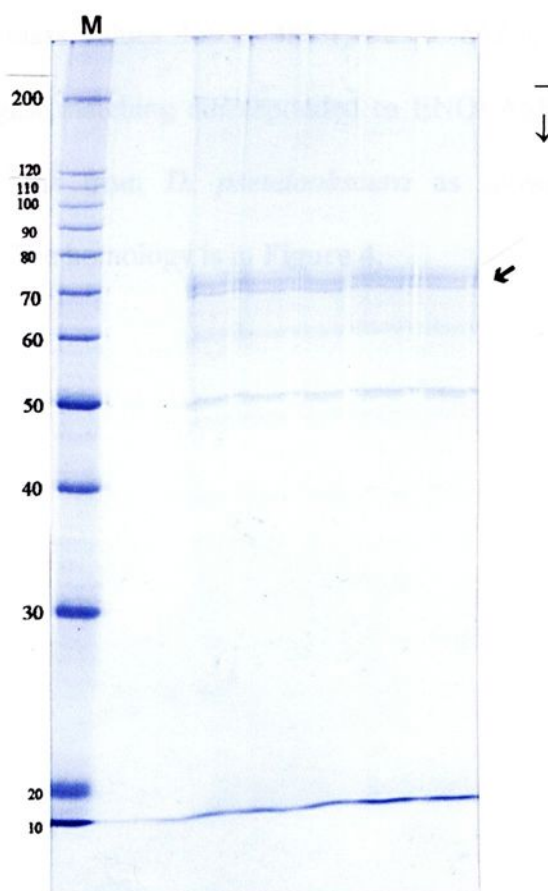


Figure 3. Components of the band EST-33 separated in SDS-PAGE. M= molecular weight marker. The arrow points to analyzed components.

polyacrylamide gels. Two very close, particularly prominent, ~70 KDA bands, were isolated and sequenced.

For identification of the protein using peptide fingerprint, six peaks corresponding to the mass values 459.6, 488.1, 523.0, 652.6, 757.2 and 766.7 were chosen. The largest matching corresponded to ENOLASES of *Drosophila* species, specially to that from *D. pseudoobscura* as shown by score and expectance (E) values. The homology is in **Figure 4**.

```

p70                      AHVAVDN-----
                        ::::
gi|265 NYHGKSVLKAVAHVNDTLGPEVIKANLDVVDQAAVDNFMIKLDGTENKSKFGANAILGIS
      40      50      60      70      80      90

p70 -----
gi|265 LAVAKAGAAKKNVPLYKHIADLAGNKEIILPVPAFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGA
      100     110     120     130     140     150

p70 -----
gi|265 TTFTEAMKMGSEVYHHLKNVIKAKFGLDATAVGDEGGFAPNIQSNKEALVLITDAIAKAG
      160     170     180     190     200     210

p70 -----10-----QSWLSPEK-----
      ::
gi|265 YTGKIEIGMDVAASEFFKDGLYDLDFKNPASDKAQWLSPKXANLYQEFIKEFPITSIED
      220     230     240     250     260     270

p70 -----20-----LQLVGN-----
      ::::
gi|265 PFDQDHWDAWTNLTCTNKIQIVGDDLTVTNPKRIATAVEKGACNCLLLKVNQIGTVTESI
      280     290     300     310     320     330

p70 -----LE
      ::
gi|265 AAHLLAKKNGWGTMTVSHRSGETEDSFXGDLVVGLSTGQIKTGAPCRSERLAKYNQILRIE
      340     350     360     370     380     390

p70 30
EELGAGVK
:::: ::
gi|265 EEIGSGVKFAGKNFRKPQ
      400     410

```

Figure 4. Amino acid sequence in the comparison of EST-33 (p70) to the FASTS protein databank showing homology to *D. pseudoobscura* enolase (gi/265).

Discussion

Esterases are enzymes involved in several physiological processes. In insects, they participate in functions such as digestion (Kapin & Ahmad, 1980; Sreerama & Veerabhadrapa, 1991; Kerlin & Hugues, 1992; Argentine & James, 1995), reproduction (Richmond & Senior, 1991; Costa et al., 1983; Scott, 1986; Karotam & Oakeshott, 1993), regulation of juvenile hormone (Kort & Granger, 1981; Zera & Holtmeier, 1992; Gu & Zera, 1994), insecticide degradation (Mutero et al., 1994; Whyard et al., 1994; Feyereisen, 1995) and neuron activity (Harel et al., 2000). In *Drosophila*, as well as in other organisms, the esterases have been shown to be tissue and stage-specific (Sasaki, 1974; Pasteur & Kastritsis, 1971; Healy et al., al., 1991; Lunday & Farmer, 1983; Arnason & Chambers, 1984), reinforcing their importance in cell function and development and the existence of regulatory mechanisms modulating the expression of their corresponding genes.

In the present study, the esterase band EST-33 from *Drosophila austrosaltans* was analyzed. As mentioned above, this band is present in every fly from every strain from the four species in the *Saltans* subgroup, previously examined (Nascimento & Bicudo, 2002). Another study being carried out in our laboratory showed that it is also present in the species from the other subgroups of the *saltans* group (Bernardo, personal information). In addition, *D. melanogaster*, which was used in the first mentioned study as an outgroup, and *D. bifasciata* and *D. willistoni* (our data not shown) also presented a corresponding band, similar in position in the gel and in morphological and biochemical features. These

observations suggested that this band was conserved in the evolution of the *Sophophora* subgenus.

The analysis of EST-33 in body parts showed that it is predominantly expressed in the head and thorax (**Figures 1A and 2A**), while the analysis of organs showed it predominantly in the eyes and in the head remains after dissection of the eyes (**Figures 1B,C and 2B,C**). Larvae, pupae and adults express the band, although the degree of activity is higher in adults (**Figures 1D and 2D**).

The results were strongly indicative of EST-33 involvement in the neuronal physiology. In addition, the biochemical analysis of this band, based on the use of eserine and Malathion as inhibitors, indicated that it is a cholinesterase (Nascimento & Bicudo, 2002). Thus, after its amino acid sequencing, the first idea was to compare it to the already known *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase. Taken together, the features distribution in body parts, in organs, the constant presence during development, and the biochemical classification were solid justifications for that decision. However, we were surprised to find a greater homology of the EST-33 peptide sequence to *D. pseudoobscura* enolase and not to acetylcholinesterase, as expected. The sequencing was repeated twice in order to confirm the results, although the technique used and the laboratory that carried it out were trustworthy. EST-33 and the enolase from *D. pseudoobscura* have different molecular weights (~70 KDa and ~55 KDa, respectively). *D. melanogaster* enolase shows an even lower molecular weight (~46 KDa - Bishop & Corces, 1990). However, we know that post-translational modifications, such as glycosylations and dimerizations may

change the molecular weight of enzymes, without affecting their activity (Mutero & Fournier, 1992). This might be the case of *D. austrosaltans* enolase.

The enzyme enolase (2 phospho-D-glycerate hydrolase) (EC 4.2.1.11) is a dimeric enzyme of the glycolytic pathway, responsible for catalyzing the conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate. It has been studied mainly in vertebrates with numerous sequences available, although it is found in all organisms (Tracy & Hedges, 2000).

In higher eukaryotes, enolase exists as three distinct isoforms (α , β , γ), which are encoded by separate genes. Expression of the β isoform appears to be restricted to muscle, the γ enolase has been described as neuron-specific enolase (NSE) and the α isoform appears to be expressed in all tissues examined to date (review in Gitlits et al., 2000).

The γ enolase is the only form present at a high level in the brain and at intermediate levels in peripheral nervous tissue and various neuroendocrine glands, being considered a specific marker for neurons, neuroendocrine cells, and their derived tumors (Marangos, 1987). NSE has been detected in normal human retina and retinoblastoma tumor (Molnar *et al.*, 1984), as well as in the bovine retina (Li et al., 1995). In addition, a role during development may be suggested by evidence that NSE can act as a neuronotrophic factor in the central nervous system, which promotes survival of embryonic rat neocortical neurons in primary culture over a 4-6 day period (Li et al., 1995).

Thus, the γ enolase, at this moment, seems to be the best choice to correspond to the *D. austrosaltans* EST-33.

As shown in literature, sequence identity values of enolases from different organisms are variable. For example, chicken β -enolase shares 84–85% amino acid sequence with mammalian β -enolases, around 70% with *D. melanogaster* and 60% with two yeast enolases (Tanaka et al., 1995). The NSE from human and bovine retina showed amino acid sequences virtually identical to each other (Li et al., 1995). Hannaert et al. (2000) extracted enolase homologs from databases and produced an alignment encompassing 62 sequences and 400 sites. Overall, enolase sequences are highly conserved, showing roughly 40% amino acid identity across eukariotes, eubacteria and archaebacteria.

The EST-33 enolase showed ~62% of sequence identity with *D. pseudoobscura* enolase and 59% with *D. melanogaster* enolase. Between *D. pseudoobscura* enolase and *D. melanogaster* acetylcholinesterase there is only 11% of sequence identity.

Evolutionary analyses of the vertebrate enolases based on amino acid sequence and nucleotide sequences and intron length suggested that (a) the paralogs rapidly arose from a single ancestral gene through a “burst” event early in vertebrate evolution; (b) that β and γ -enolases are the two most closely associated genes and that (c) enolase gene duplications occurred between 200 and 300 Mya (review in Tracy & Hedges, 2000). In *Drosophila*, according to the same authors, the paucity of data yet available makes it impossible to formulate a hypothesis on the subject

Enolase, like acetylcholinesterase, is affected by organophosphorous insecticides. Organophosphates phosphorylate the serine hydroxyl group of cholinesterases at the site of acetylcholine action. They bind irreversibly,

deactivating the esterase, resulting in accumulation of acetylcholine, which disrupts neural transmission (Harel et al., 2000). In humans, enolase affected by certain organophosphorous insecticides causes delayed neuropathy, which takes at least 10 days to develop following a single acute exposure (review in Dyro, 2003). This late toxicity is a result of phosphorylation of the NSE, a receptor protein also called neuropathy target esterase according to that author. Pathological examination reveals central-peripheral distal primary axonopathy and secondary demyelination (Lotti et al., 1984).

Although being much studied in vertebrates, especially in mammals, several important aspects related to the enolase action still remain to be understood. The EST-33 esterase from *D. austrosaltans*, as indicated by the present data, is apparently a neuron specific enolase that can be homologous to human NSE. Because *Drosophila*, for many known reasons is a highly convenient organism for research, the existence of a neuron-specific enolase in *D. austrosaltans* (for which there are also biological and biochemical information, in addition to the peptide sequence) increases the possibility of, once more, using this system for clarifying aspects of an important physiological process, now related to this enzyme action.



Acknowledgements

Thanks are due to CAPES for the fellowship given to A. P. N, to the Center of Protein Studies at USP, Ribeirão Preto, SP for technical assistance in protein identification, to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support and to Dr. Peter James Harris for English language revision.

References

- ARGENTINE, J. A. & A. A. JAMES, 1995. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Molec. Biol. 25 (5): 621-630.
- ARNASON, E. & G. B. CHAMBER, 1984. Substrate specificity of esterase in *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila melanogaster* with notes on tissue localization of esterase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. Dros. Inf. Serv. 60: 52-53.
- BISHOP, J. G. & CORCES V. G., 1990. The nucleotide sequence of a *Drosophila melanogaster* enolase gene. Nucleic Acids Research 18 (1): 191.
- COSTA, R., L. NIGRO & G. A. DANIELI, 1983. Esterase-6 allozymes: biochemical studies of two common and one rare variant in *Drosophila melanogaster*. Biochem. Genet. 21 (1/2): 191-197.
- DEMEREK, M. & B. P. KAUFMANN, 1945. *Drosophila* guide. The Lord Baltimore Press, Baltimore, Maryland.
- DYRO, F. M. Organophosphates. Available at: <http://www.emedicine.com/neuro/topic286.htm>. Access on July 23, 2003.
- FEYEREISEN, R., 1995. Molecular biology of insecticide resistance. Toxicol. Lett. 82 (83): 83-90.
- GITLITS, V. M., B. H. TOH, K. L. LOVELAND & J. W. SENTRY, 2000. The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. Euro J. Cell Biol. 79: 104-111.



- GU, X. & A. J. ZERA, 1994. 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. 107 (4): 553-560.
- HANNAERT, V., H. BRINKMANN, U. NOWITZKI, J. A. LEE, M. A. ALBERT, C. W. SENSEN, T. GAASTERLAND, M. MÜLLER, P. MICHELS & W. MARTIN., 2000. Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. Mol Biol. Evol. 17 (7): 989-1000
- HAREL, M., G. KRYGER, T. L. ROSENBERRY, W. D. MALLENDER, T. LEWIS, R. J. FLETCHER, J. M. GUSS, I. SILMAN & J. L. SUSSMAN. 2000. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes. Protein Science 9:1063-1072
- HEALY, M. J., M. M. DUMANCIC, & J. G. OAKESHOT, 1991. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. Biochem. Genet. 29: 365-388.
- JOHNSON, F. M., C. G. KANAPI, R. H. RICHARDSON, M. R. WHEELER & W. S. STONE, 1966. XVIII. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparison. Univ. Texas Publ., v. 6615, p. 517-532.

- KAPIN, M. A. & S. AHMAD, 1980. Esterases in larval tissue of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): Optimun assay conditions, quantification and characterisation. *Insect Biochem.* 10: 331-337.
- KAROTAN, J. & J. G. OAKESHOTT, 1983. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity* 71: 41-50.
- KERLIN, R., L. & S. HUGHES, 1992. Enzymes in saliva from four parasitic arthropods. *Med. Vet. Entom.* 6: 121-126.
- KORT, C. A. D. & N. A. GRANGER, 1981. Regulation of the juvenile hormone titer. *Annu. Rev. Entomol.* 26: 1-28.
- LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- LI, A., W. S. LANE, L. V. JOHNSON, G. J. CHADER, & TOMBRAN-TINK, 1995. Neuron-specific enolase: a neuronal survival factor in the retinal extracellular matrix? *J. Neuro.* 15 (1): 385-393.
- LOTTI, M., C. E. BECKER & M. J. AMINOFF, 1984. Organophosphate polyneuropathy: pathogenesis and prevention. *Neurology* 34: 658-662.
- LUNDAY, A. J. & J. L. FARMER, 1983. Tissue localisation of esterase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. *Biochem. Genet.* 21 (5/6): 453-463.
- MARANGOS, P. J., 1987. Neuron-specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci* 10: 269-295.
- MOLNAR, M. L., K. STEFANSON, L. S. MARTON, R. S. TRIPATHI & G. K. MOLNAR., 1984. Imunohistochemistry of retinoblastoma in humans. *Am. J. Ophthalmol* 93: 301-307.

- MUTERO, A. & D. FOURNIER, 1992. Post-translation modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase In vitro mutagenesis and expression in *Xenopus oocytes*. J. Biol. Chem. 267 (3): 1695-1700.
- MUTERO, A., M. PRALAVORIO, J. M. BRIDE, & D. FOURNIER, 1994. Resistance associated with point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91: 5922-5926.
- NASCIMENTO, A. P. & H. E. M. C. BICUDO, 2002. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the saltans subgroup (*saltans* group). Genetica 114: 41-51.
- PASTEUR, N., & C. D. KASTRITSIS, 1971. Developmental studies in *Drosophila*. I. Acid phosphatases, esterases and other proteins in organs and whole-fly homogenates during development of *D. pseudoobscura*. Develop. Biol. 26: 525-536.
- PATTERSON, S. D., 2000. Proteomics: the industrialization of protein chemistry. Current Opinon in Biotechnology, 11 (4): 413-418.
- RICHMOND, R. C., A. SENIOR, 1991. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: Kinetics of transfer to females, decay in females and males recovery. J. Insect Physiol. 27: 849-853.
- SASAKI, F., 1974. Esterase isozymes of *Drosophila virilis*: developmental aspect of the α - and β -esterases and their distribution in the body parts. Japan J. Genetics 49 (4): 223-232.
- SCOTT, D., 1986. Inhibition of female *Drosophila melanogaster* remating by a seminal fluid protein (esterase 6). Evolution 40: 1084-1091.

- SIUZDAK, G., 1996. Mass spectrometry for biotechnology. Academic Press, San Diego.
- SREERAMA, L. & P. S. VEERABHADRAPPA, 1991. Purification and properties of carboxylesterases from the mid-gut of the termite *Odentotermis worini*. *Insect Biochem.* 21 (8): 833-844.
- STEINER, W. W. M. & W. C. JOHNSON, 1973. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. US – IBP. Island Ecosyst. Tech. Rep. 31: 1-21.
- STONE, K. L. & K. R. WILLIAMS, 1997. Enzymatic cleavage and HPLC peptide mapping of proteins. *Mol Biotechnol* 8 (2): 155-167.
- TANAKA, M., K. MAEDA & K. NAKASHIMA, 1995. Chicken alpha-enolase but not beta-enolase has a src-dependent tyrosine-phosphorylation site: cDNA cloning and nucleotide sequence analysis. *J. Biochem.* 117 (3): 554-559.
- TOWNSON, H., 1972. Esterase polymorphism in *Aedes aegypti*: the genetics and K_m values of electrophoretically heterogeneous forms. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 66 (2): 254-266.
- TRACY, M. R. & S. B. HEDGES, 2000. Evolutionary history of the enolase gene family. *Gene*. 259: 129-138.
- ZERA, A. J. & C. L. HOLTMEIER, 1992. In vivo and in vitro degradation of juvenile hormone-III in presumptive long-winged and short-winged *Gryllus rubens*. *J. Insect Physiol.* 38 (1): 61-74.
- WHYARD, S., A. E. R. DOWNE & V. K. WALKER, 1994. Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24 (8): 819-827.

VI. DISCUSSÃO GERAL

VI. DISCUSSÃO GERAL

Apesar do grande avanço ocorrido nos últimos anos, um dos principais problemas ainda pouco resolvidos na genética moderna diz respeito aos mecanismos pelos quais a expressão dos genes estruturais nas células, é regulada ou modulada, programando os eventos moleculares que levam ao desenvolvimento e ao desempenho de papéis específicos. As proteínas e outras macromoléculas fornecem um excelente indicador para o monitoramento do padrão de expressão dos genes codificadores no desenvolvimento e no entendimento dos mecanismos reguladores subjacentes, responsáveis pela expressão gênica diferencial nos eucariotos. Entre os vários estudos enzimáticos, o das esterases tem sido uma boa fonte de informações a esse respeito.

Nascimento e Bicudo (2002) estudaram, em gel de poliacrilamida, o padrão de esterases em quatro espécies do subgrupo *saltans* de *Drosophila* (*D. prosaltans*, *D. saltans*, *D. austrosaltans* e *D. septentriosaltans*). Trinta e quatro bandas foram detectadas e incluídas em nove locos. O presente estudo teve como objetivo aprofundar o conhecimento da expressão dessas esterases. Os resultados obtidos em três espécies (*D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. austrosaltans*) foram incluídos em três trabalhos.

No primeiro deles, o padrão de esterases foi analisado em larvas e pupas. Casulos vazios de pupas também foram analisados com o mesmo propósito. Entre as 32 bandas esterásicas, previamente detectadas nos adultos das três espécies e tentativamente distribuídas em nove locos, 17, incluídas em sete dos nove, foram observadas nos géis analisados neste estudo. Os resultados mostraram que, além



de expressar o maior número de bandas esterásicas, os adultos exibiram o maior grau de expressão de algumas das bandas partilhadas pelas três espécies. Esta situação é diferente daquela encontrada em outros organismos, como *Aedes aegypti*, que mostrou maior atividade no estágio larval (Lima-Catelani et al., no prelo). Entre as espécies de *Drosophila*, *D. rajasekari*, mostrou atividade máxima de bandas no estágio de pupa (Prakash & Reddy, 1978) e *D. virilis*, em adultos e no terceiro estágio larval (Sasaki, 1974).

Uma das bandas, a EST-34, mostrou frequência de expressão significativamente maior em larvas e pupas do que em adultos, sugerindo um envolvimento fisiológico maior naqueles estádios.

A ocorrência de divergência entre as espécies, no que se refere ao controle genético das esterases, foi observada também em relação a três alelos do loco 3. Embora as bandas correspondentes estivessem presentes nos adultos das três espécies, elas se expressaram, nos estádios prévios do desenvolvimento, apenas em *D. prosaltans* (EST-12 e EST-13) ou em *D. austrosaltans* (EST-15).

Cinco novas bandas foram observadas durante as fases do desenvolvimento anteriores à adulta, e todas estavam presentes nos casulos. Elas foram nomeadas EST-LC, EST-LPC, EST-C1, EST-C2 e EST-C3. Entre elas, uma foi detectada também no estágio larval (EST-LC), e outra nos estádios larval e de pupa (EST-LPC). Três foram exclusivas dos casulos (EST-C1, EST-C2 e EST-C3). O uso dos inibidores Malathion e eserina sugeriu que duas delas (EST-LC e EST-C1) são carboxilesterases, pois foram inibidas apenas pelo Malathion. A EST-LC foi incluída em um novo loco denominado 3-4 e EST-C1



foi incluída em um novo loco denominado 7-8, devido à posição das mesmas nos géis, isoladas entre esterases bioquimicamente diferentes.

Os casulos também mostraram bandas previamente detectadas nos adultos. Pelo menos sete destas bandas exibiram baixa frequência e expressão nos casulos. A banda EST-33, que ocorre em 100% dos adultos, foi observada em todas as amostras de casulos, com atividade menor que nas larvas e pupas. Diferentemente, a banda EST-34 exibiu, nos casulos, alta frequência e o mesmo nível de expressão dos adultos, larvas e pupas.

De acordo com a literatura, as esterases desempenham várias funções, envolvidas na digestão (Kapin & Ahmad, 1980; Sreerama & Veerabhadrapa, 1991; Kerlin & Hugues, 1992; Argentine & James, 1995), na reprodução (Richmond & Senior, 1991; Costa et al., 1983; Scott, 1986; Karotam et al., 1995), na regulação dos níveis do hormônio juvenil (Kort & Granger, 1981; Zera & Holtmeier, 1992; Gu & Zera, 1994) e degradação de inseticidas (Mutero et al., 1994; Whyard et al., 1994; Feyereisen, 1995).

A localização de bandas esterásicas nas partes do corpo é considerada indicativa de sua função (Kambysellis et al., 1968; Lunday & Farmer, 1982; Arnason & Chambers, 1984). Em relação às esterases encontradas nos casulos e que foram também observadas em larvas e pupas, pode-se pensar que elas são, possivelmente, restos do seu conteúdo prévio. Contudo, três bandas foram encontradas apenas nessas estruturas, indicando que elas são realmente específicas das mesmas. Outros autores descreveram esterases nos casulos (Berger & Canter, 1973; Oliveira & Cordeiro, 1982; Ceron, 1988; Ritz, 1997). De acordo com Berger e Canter (acima mencionados) as enzimas dos casulos, que foram também



encontradas nas pupas, poderiam estar relacionadas com o processo de muda, mais especificamente com a digestão da cutícula. Oliveira e Cordeiro (1982) sugeriram que a EST-A, presente nos casulos de *D. melanogaster*, estaria envolvida com o metabolismo do hormônio juvenil.

Em resumo, os dados do presente trabalho mostraram que as bandas esterásicas em *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. austrosaltans* apresentam um padrão caracterizado por regulação diferencial ao longo do desenvolvimento e em órgãos específicos, o que recomenda a continuidade dos estudos pela possibilidade de obter informações importantes sobre o controle genético dessas esterases.

No segundo trabalho, foram estudadas, mais profundamente, três bandas α -esterásicas descritas por Nascimento e Bicudo (2002), que as denominaram EST-5, EST-6 e EST-7. Essas bandas estão presentes, respectivamente, nas espécies *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. austrosaltans*. Sua expressão varia, dependendo do sexo das moscas. A EST-6 apresenta maior grau de atividade nas fêmeas do que nos machos, enquanto o oposto ocorre com EST-5 e EST-7. Com base no uso de inibidores específicos, essas enzimas haviam sido classificadas como carboxilesterases e consideradas como produzidas por alelos do loco 2 (Nascimento & Bicudo, 2002). As três enzimas apresentaram uma pequena diferença no grau de migração no gel, sugerindo alteração de carga e peso molecular. A sequência de sua numeração acompanha a sequência de sua localização, da extremidade menos anódica para a mais anódica.

A análise de duas linhagens de *D. prosaltans* mostrou que mesmo entre linhagens pode ocorrer diferença de expressão das esterases, embora mantendo o padrão básico de maior expressão nos machos do que nas fêmeas.



Essas bandas foram analisadas quanto ao padrão de expressão nas partes do corpo (cabeça, tórax e abdome) e em órgãos (olhos, restos da cabeça após dissecação dos olhos, espermatecas, testículos, ductos digestivos e túbulos de Malpighi). A análise das três partes do corpo mostrou que as esterases EST-5 e EST-7 partilham o mesmo padrão de distribuição. Ambas estão presentes na cabeça de fêmeas e machos e no abdome de machos. Já EST-6 ocorreu exclusivamente na cabeça de ambos os sexos.

Quanto à análise dos órgãos, EST-5 foi detectada nos olhos e nos restos da cabeça, mas EST-7, que havia exibido baixa atividade na cabeça inteira, não foi detectada quando esta foi separada nas duas partes. A análise dos órgãos abdominais dos machos mostrou que as bandas EST-5 e EST-7 ocorrem nos testículos e no ducto digestivo, mas apenas EST-5 se expressou nos túbulos de Malpighi. A banda EST-6 foi detectada nos olhos e nos restos da cabeça, mas nos machos a enzima cora-se fracamente indicando baixa expressividade, enquanto nas fêmeas, a expressão é maior, principalmente nos restos da cabeça.

A literatura inclui muitos estudos sobre a distribuição tecidual das esterases. Contudo, as funções das mesmas permanecem especulativas, em muitos casos, apenas sugeridas por sua presença em certos tecidos. Entre as esterases mais conhecidas estão as β -esterases 6 de *D. melanogaster* (Richmond et al., 1980) e 5 de *D. pseudoobscura* (Arnason, 1982). A função da esterase 6 está relacionada à reprodução. Esta enzima foi detectada no ducto ejaculatório espermático, sendo transferida para as fêmeas durante a cópula; ela hidrolisa o acetato cis-vacênol nas fêmeas e o produto é um inibidor de nova cópula durante algum tempo (Mane et al., 1983). EST-5 de *D. pseudoobscura* está presente no



abdome inteiro (Lunday & farmer, 1983; Arnason & Chambers, 1984). Arnason e Chambers (1984) consideraram que dados sobre esterase 5 de *D. pseudoobscura* e 6 de *D. melanogaster* suportam o modelo de homologia entre elas, mas sua localização tecidual demonstra claramente que seus locos estão sob diferentes formas de regulação no desenvolvimento. Em *D. melanogaster* transformada, 4 regiões reguladoras de *Est-6* atuando independentemente, dirigem a expressão do gene da β -galactosidase em diferentes órgãos (Ludwig et al., 1993).

Como Ludwig et al. (1993) mencionaram em relação ao loco do gene da esterase-6 de *D. melanogaster* e alelos de espécies relacionadas, nós também consideramos que a variabilidade do padrão de expressão espécie-específica e órgão-específica, e a variabilidade no nível de expressão entre linhagens, fazem das esterases EST-5, EST-6 e EST-7, um sistema útil para estudo da evolução da regulação gênica no subgrupo *saltans*.

Dados sobre a expressão das esterases nas partes do corpo e órgãos suportam as relações filogenéticas evolutivas entre *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. austrosaltans* verificadas com base no polimorfismo cromossômico (Bicudo, 1973b) e nos padrões de esterases (Nascimento & Bicudo, 2002). A expressão de EST-5 em *D. prosaltans* (que é considerada a espécie tronco no subgrupo *saltans*, de acordo com Throckmorton & Magalhães, 1962 e Bicudo, 1973b), é mais similar à expressão de EST-7, de *D. austrosaltans* (considerada intermediária entre *D. prosaltans* e *D. saltans* nas relações filogenéticas acima mencionadas) do que à expressão de EST-6, de *D. saltans* (considerada a mais derivada entre as espécies analisadas neste trabalho, de acordo com Bicudo, 1973b).



Se por um lado, as informações do presente estudo reforçam a idéia prévia de que as três bandas são codificadas por alelos do mesmo loco, submetidos a modificações no processo de divergência das espécies, por outro, muitos problemas permanecem, parte dos quais foram levantados neste trabalho. Além dos problemas de natureza molecular, principalmente relacionados aos tipos de alterações genéticas ocorridas entre os genes codificadores dessas esterases, há outros de natureza fisiológica. Por exemplo: como explicar a presença das enzimas EST-5 e EST-7 apenas na cabeça das fêmeas? Por que elas não são necessárias no funcionamento dos órgãos abdominais como foi observado nos machos? Outra questão está relacionada à EST-6. Por que esta enzima está presente apenas na cabeça de fêmeas e machos, com expressão maior nas primeiras do que nos segundos?

Certamente ainda serão necessários muitos estudos para melhor conhecimento dessas esterases. Nosso próximo passo será tentar sequenciá-las e chegar aos genes que as codificam.

No terceiro trabalho analisou-se, mais profundamente, a esterase EST-33 de *D. austrosaltans*. Esta banda ocorre nas quatro espécies do subgrupo *saltans* previamente analisadas por Nascimento e Bicudo (2002) e em 100% dos indivíduos analisados. Dados de Nascimento e Bicudo, não publicados, mostram que ela também está presente em larvas, pupas e até casulos vazios de pupas, embora com expressão menor do que nos adultos. Outros estudos realizados em nosso laboratório mostraram que essa banda está presente também em espécies de outros subgrupos do grupo *saltans* (Bernardo, informação pessoal). Além disso, *D. melanogaster*, a qual foi utilizada por Nascimento e Bicudo (2002), como



grupo controle e *D. bifasciata* e *D. willistoni* (nossos dados não mostrados) também apresentaram uma banda correspondente, com a mesma posição no gel, mesmas características morfológicas e bioquímicas. Estas observações sugerem que esta banda pode ter sido conservada na evolução, não apenas do grupo *saltans*, mas, também do próprio subgênero *Sophophora*.

A análise da EST-33, nas partes do corpo, mostrou que sua expressão predominantemente na cabeça e tórax, enquanto a análise dos órgãos mostrou-a com predominância, nos olhos e nos restos da cabeça.

Os resultados foram fortemente indicativos do envolvimento da EST-33 na fisiologia neural. Além disso, a análise bioquímica desta banda, baseada no uso da eserina e Malathion como inibidores, indicou que ela é uma colinesterase (Nascimento & Bicudo, 2002). Assim, após seu sequenciamento, utilizando a espectrometria de massa, a idéia inicial foi compará-la a já conhecida acetilcolinesterase de *D. melanogaster*. A distribuição nas partes do corpo, nos órgãos, a presença constante durante o desenvolvimento e a classificação bioquímica foram sólidas justificativas para tal decisão. Contudo, ficamos surpresas com uma homologia maior da sequência de peptídeos da EST-33 à enolase de *D. pseudoobscura* e não à acetilcolinesterase, como esperado. EST-33 e enolase de *D. pseudoobscura* têm pesos moleculares diferentes (~70 KDa e ~55KDa, respectivamente). A enolase de *D. melanogaster* mostra peso molecular ainda mais baixo (~46 KDa – Bishop & Corces, 1990). Contudo, sabemos que modificações pós-transcricionais, tais como glicosilações e dimerizações podem alterar o peso molecular das enzimas, sem afetar sua atividade (Mutero & Fournier, 1992). Este pode ser o caso da enolase de *D. austrosaltans*.



A enolase (2 fosfo-D-glicerato hidrolase) (EC 4.2.1.11) é uma enzima dimérica da via glicolítica, responsável pela conversão do 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato. Ela tem sido estudada principalmente nos vertebrados, os quais apresentam muitas seqüências disponíveis, embora seja encontrada em todos os organismos (Tracy & Hedges, 2000).

Nos eucariotos superiores, ocorrem três formas distintas da enolase (α , β , γ) as quais são codificadas por genes separados. A expressão da forma β parece ser restrita ao músculo, a forma γ tem sido descrita como uma enolase específica dos neurônios (NSE) e a forma α parece se expressar em todos os tecidos (revisão em Gitlits et al., 2000).

A γ é a forma presente em alto nível no cérebro e em níveis intermediários no tecido nervoso periférico e em várias glândulas neuroendócrinas, sendo considerada um marcador específico para neurônios, células endócrinas e tumores derivados das mesmas (Marangos, 1987). NSE tem sido detectada na retina humana normal, no tumor retinoblastoma (Molnar *et al.*, 1984), bem como na retina bovina (Li et al., 1995). Além disso, o envolvimento da enolase durante o desenvolvimento pode ser sugerido pela evidência de que a NSE pode atuar como um fator neurotrófico do sistema nervoso, promovendo a sobrevivência dos neurônios neocorticais de embriões de ratos em cultura primária, no período de 4-6 dias (Li et al., 1995).

Assim, a γ enolase parece ser a melhor escolha para corresponder à EST-33 de *D. austrosaltans*.



Como mostra a literatura, os valores de identidade das seqüências da enolase de diferentes organismos são variáveis. Por exemplo, a β -enolase de galinha partilha 84-85% da seqüência de aminoácidos com a β -enolase de mamífero, por volta de 70% com *D. melanogaster* e 60% com duas enolases de levedura (Tanaka et al., 1995). A NSE da retina humana e bovina mostraram seqüências de aminoácidos idênticas (Li et al., 1995). Hannaert et al. (2000) extraiu homólogos de enolase de um conjunto de dados e produziu um alinhamento abrangendo 62 seqüências e 400 sítios. As seqüências de enolase são altamente conservadas, mostrando 40% de identidade através dos eucariotos, eubacteria e archaeobacteria.

A enolase EST-33 mostrou ~62% de identidade de seqüência com a enolase de *D. pseudoobscura* e 59% com a enolase de *D. melanogaster*. Entre a enolase de *D. pseudoobscura* e a acetilcolinesterase de *D. melanogaster* há apenas 11% de identidade da seqüência.

Análises evolutivas da enolase de vertebrados baseadas na seqüência de aminoácidos e seqüências de nucleotídeos e tamanho do intron sugeriram que: (a) os parálogos originaram rapidamente de um gene ancestral comum através de um evento primário de “explosão” na evolução dos vertebrados, (b) que β e γ -enolases são produtos dos dois genes mais próximos e as duplicações gênicas ocorreram entre 200 a 300 milhões de anos (revisão em Tracy & Hedges, 2000). Em *Drosophila*, de acordo com os autores, a falta de dados torna impossível formular uma hipótese sobre o fato.

A enolase, como a acetilcolinesterase, é afetada por inseticidas organofosforados. Os organofosfatos fosforilam o grupo hidroxil serina das



colinesterases no sítio de ação da acetilcolina. Eles se ligam irreversivelmente, desativando a esterase, resultando no acúmulo de acetilcolina, a qual interrompe a transmissão neural (Harel et al., 2000). Em humanos, a enolase afetada por certos inseticidas organofosforados causa neuropatia retardada, a qual leva pelo menos 10 dias para desenvolver-se, após uma simples exposição (revisão em Dyro, 2003). Esta toxicidade tardia é o resultado de fosforilação da NSE, uma proteína receptora também chamada esterase alvo de neuropatia, de acordo com o autor.

Embora seja muito estudada nos invertebrados, especialmente em mamíferos, vários aspectos importantes relacionados à ação da enolase ainda não são entendidos. A esterase EST-33 de *D. austrosaltans*, como indicado pelos dados apresentados, é aparentemente uma enolase neurônio-específica que pode ser homóloga da NSE humana. Porque a *Drosophila*, por muitas razões conhecidas, é um organismo conveniente para pesquisa, a existência de uma enolase neurônio específica em *D. austrosaltans* (para a qual existem, outras informações biológicas e bioquímicas, além da sequência de peptídios) aumenta a possibilidade de, mais uma vez, usar este organismo para esclarecer aspectos de um processo fisiológico importante, agora relacionado à ação daquela enzima.

Entendemos que, no conjunto, os resultados obtidos no presente estudo e incluídos nos três trabalhos, permitiram atingir o objetivo de ampliar (mas não esgotar) o conhecimento do padrão de esterases, em espécies do subgrupo *saltans*.



2000-01-01

...
...
...
...
...

...
...
...

...
...
...

...
...
...
...
...

VII. CONCLUSÕES

...
...

VII. CONCLUSÕES

1- Nas espécies analisadas as esterases estão submetidas a controle de expressão no desenvolvimento, nas partes do corpo e nos tecidos. Exemplos: das 32 bandas previamente detectadas nos adultos das três espécies, 17 expressaram-se nas larvas, pupas e casulos vazios de pupas; as bandas EST-5 e EST-7 expressaram-se no abdome de machos, mas não no de fêmeas;

2- As três espécies diferem quanto ao padrão de expressão de bandas partilhadas; algumas bandas como a EST-12 e EST-13 (Loco 3) presentes nas três espécies, expressaram-se apenas nas larvas e pupas de *D. prosaltans*;

3- A frequência de expressão de uma banda presente nos três estádios pode variar: a banda EST-34 expressou-se com maior frequência em larvas e pupas do que em adultos;

4- As bandas EST-5, EST-6 e EST-7 mostraram-se importantes para estudos das modificações ocorridas no processo de divergência das espécies. Sua expressão reforça a idéia de proximidade maior entre *D. prosaltans* e *D. austrosaltans* do que de ambas com *D. saltans*, como indicado também por dados obtidos com inversões e padrão total de esterases;

5- A banda EST-33, presente em 100% das moscas e em todas as fases do desenvolvimento, por sequenciamento dos aminoácidos e comparação com o

banco de dados FASTS mostrou corresponder à enolase de *D. pseudoobscura*, confirmando que se trata, de fato, de proteína fisiologicamente importante.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIDGE, W. M. Larval ecdysis. Two types of ecdysis, an and 00 ecdysis, in *Psephenoides acuminatus*, pupariation and ecdysis, and a method for their recognition. *Biochem. J.*, v. 21, p. 110-117, 1957.

ARBERMAN, M. N., FURLONG, E. E. M., BAKER, B. A., KRAVCHAK, L., NITZ, S. H., BAKER, B. A., KRANSHAW, M. A., SCOTT, M. P., DAVIS, P. W., WHITE, R. P. Gene expression during the life cycle of *Dracophila angustipennis*. *Science*, 259, p. 2270-2275, 1992.

ARLINGTON, J. A., JAMES, B. A. Characterization of a novel glycolytic enzyme in the vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 23, p. 1-11, 1993.

BECKMAN, J. An experimental study of resistance to the malarial protozoan, *Plasmodium*, in *Dracophila pseudoobscura*. *Hereditas*, v. 46, p. 1-27, 1962.

BRANSON, L., CHAMBER, G. H. Substrate specificity differences in *Dracophila pseudoobscura* and *Dracophila angustipennis* with respect to their utilization of sugar 5 in *Dracophila pseudoobscura*. *Dev. Biol. Sci.*, v. 62, p. 52-55, 1981.

BARKER, R. P. Sequential gel electrophoretic analysis of ecdysis in *Anopheles gambiae*, *Dracophila* and *Culex*. *Genetics*, v. 72, p. 105-115, 1973.

BECKMAN, J., JOHNSON, J. M. Larval ecdysis in *Dracophila pseudoobscura*. *Hereditas*, v. 31, p. 211-229, 1954.

BURGER, P. M., CHEN, R. The ecdysis of *Dracophila*. I. The ecdysis enzymes and their position. **VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

DEUTER, H. E. M. C. Reproductive cycles in the various stages of *Dracophila*. I. The various stages. *Genetics*, v. 62, p. 11-17, 1973.

DEUTER, H. E. M. C. Ecdysis and ecdysis enzymes in the various stages of *Dracophila*. I. The various stages. *Genetics*, v. 62, p. 11-17, 1973.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIDGE, W. N. Serum esterase. Two types of esterase (A and B) hydrolyzing p-nitrophenil acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. **Biochem. J.**, v. 53, p. 110-117, 1953.

ARBEITMAN, M. N.; FURLONG, E. E. M.; IMAM, F.; JOHNSON, E.; NULL, B. H.; BAKER, B. S.; KRASNOW, M. A.; SCOTT, M. P.; DAVIS, R. W.; WHITE, K. P. Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. **Science**, 297, p. 2270-2275, 2002.

ARGENTINE, J. A.; JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 25, n. 5, p. 621-630, 1995.

ARNASON, E. An experimental study of neutrality at the malic dehydrogenase and esterase-5 loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Hereditas**, v. 96, p.13-27, 1982.

ARNASON, E.; CHAMBER, G. B. Substrate specificity of esterase in *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila melanogaster* with notes on tissue localization of esterase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. **Dros. Inf. Serv.**, v. 60, p. 52-53, 1984.

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.; 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.



BISHOP, J. G. & CORCES V. G. The nucleotide sequence of a *Drosophila melanogaster* enolase gene. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.1, p. 191, 1990.

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.

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

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. arizonae* e seus híbridos. 1988. 142f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP.

COLLET, C.; NIELSEN, K. M.; RUSELL, R. J.; KARL, M. Molecular analysis of duplicated esterase genes in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 7, n. 1, p. 9-28, 1990.

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.

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.

DUMANCIC, M. M.; OAKESHOTT, J. G.; RUSSELL, R. J.; HEALY, M. J. characterization of the EST-p protein in *Drosophila melanogaster* and its conservation in drosophilids. **Biochem. Genet.**, v. 35, p. 251-269, 1997.

DYRO, F. M. Organophosphates. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/neuro/topic286.htm>>. Acesso em 23 de julho, 2003.

EAST, P. D. Non-specific esterases of *Drosophila buzzatii*. In: BARKER, I. S. F.; STAMER, W. T. Ecological Genetics and Evolution. The cactus-yeast *Drosophila* Model System. (1 Ed.). Sidney (Australia): **Academic Press**. 1982, p. 323-338.

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, 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.

GITLITS, V. M.; TOH, B. H.; LOVELAND, K. L.; SENTRY, J. W. The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. **Euro J. Cell Biol.**, v.79, p.104-111, 2000.

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.

HANNAERT, V.; BRINKMANN, H.; NOWITZKI, U.; LEE, J. A.; ALBERT, M. A.; SENSEN, C. W.; GAASTERLAND, T.; MÜLLER, M.; MICHELS, P.; MARTIN, W. Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. **Mol. Biol. Evol.**, v.17, n.7, p.989-1000, 2000.

HAREL, M.; KRYGER, G.; ROSENBERRY, T. L.; MALLENDER, W. D.; LEWIS, T.; FLETCHER, R. J.; GUSS, J. M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes. **Protein Science**, v.9, p.1063-1072, 2000.

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.

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.

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.; 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.

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. Genet.**, 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): Optimum 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.

KENNEDY, B. P.; AAMODT, E. J.; FRANCES, L. A.; CHUNG, 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.; 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.

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.

LARANJA, A. T.; BICUDO, H. E. M. C.; MANZATO, A. J. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. **Genet. Molec. Biol.**, v.26, n.4, p.419-429, 2003.

LI, A.; LANE, W. S. JOHNSON, L. V. CHADER, G. J.; TOMBRAN-TINK. Neuron-specific enolase: a neuronal survival factor in the retinal extracellular matrix? **J. Neuro.**, v.15, n.1, p.385-393, 1995.

LIMA-CATELANI, A. R. A Padrão de esterase de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. 1996. 126f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP.

LIMA-CATELANI, A. R., CERON, C. R.; BICUDO, H. E. M. C. Genetic Variation during development, revealed by esterase patterns of *Aedes aegypti*. **Biochem. Genet.**, 20003. No prelo.

LUNDAY, A. J.; FARMER, J. L. Tissue localization of esterase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. **Biochem. Genet.**, v. 21, n. 5/6, p. 453-463, 1983.

LUDWIG, M. Z.; TAMARINA, N. A; RICHMOND, R. C.. Localization of sequences controlling the spatial, temporal, and sex-specific expression of the esterase 6 locus in *Drosophila melanogaster* adults. **Procl. Natl. Acad.** v.90, p.6233-6237, 1993.

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.

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.

MARANGOS, P. J. Neuron-specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.10, p.269-295, 1987.

MATEUS, R. P. Caracterização da esterase larval em espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (grupo *repleta*). 1997. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências



Biológicas-Genética)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto-SP.

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.

MOLNAR, M. L.; STEFANSON, K.; MARTON, L. S.; TRIPATHI, R. S.; MOLNAR, G. K. Immunohistochemistry of retinoblastoma in humans. **Am. J. Ophthalmol**, v.93, p.301-307, 1984.

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.

MUTERO, A.; FOURNIER, D. Post-translation modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase In vitro mutagenesis and expression in *Xenopus oocytes*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, v.3, p. 1695-1700, 1992.

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 alpha and beta esterases isozymes. **Jpn. J. Genet.**, v. 48, n. 2, p. 119-132, 1973.

NASCIMENTO, A. P.; BICUDO, H. E. M. C. Estudo do padrão de esterases em quatro espécies do subgrupo *saltans* de *Drosophila*. 2000. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP.

NASCIMENTO, A. P.; BICUDO, H. E. M. C., Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). **Genetica**, v. 114, p. 41-51, 2002.

NORA, J. J.; FRASER, F. C. Farmacogenética. In: __. **Genética médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, cap. 24, p. 263-267.



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.

ODGERS, W. A.; AQUADRO, C. F.; COPPIN, C. W.; HEALY, M. J.; OAKESHOTT, J. G. Nucleotide polymorphism In the Est 6 promotor, which is widespread In derived populations of *Drosophila melanogaster*, changes the level of esterase 6 expressed In the male ejaculatory duct. **Genetics**, v. 162, p. 785-797, 2002.

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.

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.

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.

PRAKASH, H. S.; REDDY, G. S. Variability of alpha & beta esterase actives in the ontogeny of *Drosophila rajasekari*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 16, p. 546-548, 1978.

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

RICHMOND, R. C.; SENIOR, A. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: Kinetics of transfer to females, decay in females and males recovery. **J. Insect Physiol.**, v. 27, p. 849-853, 1991.

RITZ, F. R. C. Padrão de esterases em *Megaselia scalaris*. 1997.128 F. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Ciências Biológicas-Genética)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP.

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.

SASAKI, F. Esterase isozymes of *Drosophila virilis*: developmental aspect of the α - and β -esterases and their distribution in the body parts. **Japan J. genetics**, v. 49, 4, p. 223-232, 1974.

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.

SCOTT, D. Inhibition of female *Drosophila melanogaster* remating by a seminal fluid protein (esterase 6). **Evolution**, v. 40, p. 1084-1091, 1986.

SOUSA-POLEZZI, R. C. & BICUDO, H. E. M. C. Effect of phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti*. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, 2003. No prelo.



SPASSKY, B. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. **Univ. Texas Publ.**, v. 5721, p. 48-61, 1957.

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

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.

TAMARINA, N. A.; LUDWIG, M. Z.; RICHMOND, R. C. Convergent and conserved features in the spatial expression of the *Drosophila pseudoobscura* esterase-5B gene and esterase-6 gene of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad.**, v. 94, p. 7735-7741, 1997.

TANAKA, M.; MAEDA, K.; NAKASHIMA, K. Chicken alpha-enolase but not beta-enolase has a src-dependent tyrosine-phosphorylation site: cDNA cloning and nucleotide sequence analysis. **J. Biochem.**, v. 117, n. 3, p. 554-559, 1995.

TAVARES, M. G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Tissue-specific expression of esterases in *Triatoma infestans* (Triatoma, Heteroptera). **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 4, p. 461-464, 1998.

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.

TRACY, M. R.; HEDGES, S. B. Evolutionary history of the enolase gene family. **Gene.**, v.259, p.129-138, 2000.

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-alpha alleles to genic variation of *Drosophila virilis*. **Genet. Res.**, v. 51, p. 217-222, 1988.

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.

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.



IX. RESUMO

IX. RESUMO

Nascimento e Bicudo (2002) estudaram, em géis de poliacrilamida, o padrão de esterases de quatro espécies do subgrupo *saltans* de *Drosophila* (*D. prosaltans*, *D. saltans*, *D. austrosaltans* e *D. septentriosaltans*). Trinta e quatro bandas foram detectadas e incluídas em nove locos. O presente trabalho teve, por objetivo obter maiores informações sobre essas esterases. Larvas, pupas e casulos vazios de pupas das três primeiras espécies foram analisados para verificar variação das mesmas. Dezesete bandas incluídas em sete dos nove locos expressaram-se no desenvolvimento e nos casulos vazios. Cinco novas bandas foram detectadas, sendo uma partilhada por larvas e casulos, outra partilhada por larvas, pupas e casulos e três exclusivas de casulos. Três bandas esterásicas, EST-5 (de *D. prosaltans*), EST-6 (de *D. saltans*) e EST-7 (de *D. austrosaltans*), previamente classificadas como α -esterases, carboxilesterases e consideradas codificadas por três alelos incluídos no loco 2, também foram analisadas no presente trabalho. O grau de atividade de EST-5 e EST-7 foi maior em machos que em fêmeas. O oposto foi observado para EST-6, que mostrou atividade maior em fêmeas do que em machos. Na análise da presença das enzimas nas partes do corpo, as três bandas foram detectadas na cabeça das fêmeas e machos, mas, EST-5 e EST-7, também foram detectadas no abdome dos machos. Na análise dos órgãos, EST-5 e EST-7 foram observadas nos testículos e no ducto digestivo, mas apenas EST-5 foi detectada nos túbulos de Malpighi. EST-5 e EST-6 ocorreram nos olhos e nos restos da cabeça, enquanto EST-7 estava ausente em ambas as estruturas. A banda EST-33 de *D. austrosaltans*, classificada como α -esterase, colinesterase, foi outra



banda analisada mais profundamente. Ela mostrou ser produzida em larvas, pupas e adultos, ser fortemente expressa nos olhos e nos restos da cabeça após dissecação dos olhos e estar presente também no tórax, com baixa atividade. A proteína extraída, desta banda, analisada por espectrometria de massa seguida de busca de homologia da sequência mostrou maior identidade de aminoácidos com a enolase de *D. pseudoobscura*. As observações são consistentes com a γ -enolase dos vertebrados superiores que entre o três tipos de enolase, é neurônio-específica, estando presente no cérebro, retina, tecido nervoso periférico e glândulas neuroendócrinas. Todos estes dados, juntos, indicam que as esterases das espécies do subgrupo *saltans* são uma ferramenta importante para estudo da função das esterases e das alterações ocorridas na regulação gênica, no processo de divergência das espécies analisadas.



ABSTRACT

Abstracts of the papers presented at the 1998 Annual Meeting of the American Linguistic Association, held at the University of California, San Diego, from December 12-14, 1998. The abstracts are arranged alphabetically by author's name. The names of the authors are given in full, and the titles of the papers are given in full. The abstracts are written in English, and are intended to provide a brief summary of the main points of each paper. The abstracts are not intended to be a substitute for the full text of the papers, but rather to provide a quick overview of the content of each paper. The abstracts are written by the authors of the papers, and are intended to be a brief summary of the main points of each paper. The abstracts are not intended to be a substitute for the full text of the papers, but rather to provide a quick overview of the content of each paper.

X. ABSTRACT

Abstracts of the papers presented at the 1998 Annual Meeting of the American Linguistic Association, held at the University of California, San Diego, from December 12-14, 1998. The abstracts are arranged alphabetically by author's name. The names of the authors are given in full, and the titles of the papers are given in full. The abstracts are written in English, and are intended to provide a brief summary of the main points of each paper. The abstracts are not intended to be a substitute for the full text of the papers, but rather to provide a quick overview of the content of each paper. The abstracts are written by the authors of the papers, and are intended to be a brief summary of the main points of each paper. The abstracts are not intended to be a substitute for the full text of the papers, but rather to provide a quick overview of the content of each paper.

X. ABSTRACT

Nascimento and Bicudo (2002) studied, in polyacrylamide gels, the esterase pattern of four species from the *saltans* subgroup (*D. prosaltans*, *D. saltans*, *D. austrosaltans* and *D. septentriosaltans*). Thirty four bands were detected and included in nine loci. In the present study, larvae, pupae and empty pupal cases of the three first species were also analyzed as to the esterase pattern. Seventeen bands included in seven of the nine loci were expressed in the development and in the empty pupal cases. Five new bands were detected in pupal cases, one being also present in larvae, another also present in larvae and pupae, and the other three exclusive of pupal cases. The esterase bands EST-5 (from *D. prosaltans*), EST-6 (from *D. saltans*) and EST-7 (from *D. austrosaltans*), previously classified as α -esterases, carboxylesterases and considered codified by three alleles included in the loco 2, were also analyzed in the present work. The degree of activity of EST-5 and EST-7 was greater in males than in females. The opposite was observed for EST-6, which showed greater activity in females than in males. In the analysis of their presence in body parts, the three bands were detected in the head of males and females. However, EST-5 and EST-7 were also detected in the abdomen of males. In the analysis of the organs, the two bands were observed in the testes and in the digestive duct, but only EST-5 was detected in the Malpighian tubules. EST-5 and EST-6 were detected in the eyes and in the remains of the head, while EST-7 was absent in these structures. Another band, EST-33 from *D. austrosaltans*, was analyzed more deeply in this work. It was previously classified as α -esterase, cholinesterase. The results showed that it is produced in larvae,

pupae and adults, being strongly expressed in the eyes and in the remains of the head after dissection of the eyes; it was also present in the thorax, with lower activity. The protein extracted from this band was analyzed by mass spectrometry followed by homology sequence search showing greater identity of the amino acids with enolase of *D. pseudoobscura*. The observations are consistent with γ -enolase of the higher vertebrates; among the three enolase types, it is specific-neuron, being present in the brain, retina, periferal nervous tissue and neuroendocrine glands. The data indicates that the esterases from species in the *saltans* group are an important tool in the study of esterase function and of the gene regulation changes occurred in the process of divergence of the analyzed species.

Autorizo a reprodução em fotocópia deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa.

São José do Rio Preto, 19 de fevereiro de 2004.

Adriana Pasqueto Nascimento

