

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

**Purificação e Caracterização de uma  
esterase específica da fase larval em duas  
espécies de *Drosophila* do grupo *repleta***

VANESSA FALCHETTI LOPES

Guarapuava

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

**Purificação e Caracterização de uma  
esterase específica da fase larval em duas  
espécies de *Drosophila* do grupo *repleta***

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração em Biologia Evolutiva)

Guarapuava  
2012

Catálogo na Publicação  
Biblioteca da UNICENTRO, Campus Cedeteg

Lopes, Vanessa Falchetti  
L881p Purificação e caracterização de uma esterase específica da fase larval em duas espécies de *Drosophila* do grupo *repleta* / Vanessa Falchetti Lopes. -- Guarapuava, 2012  
xiv, 69 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação Em Biologia Evolutiva, em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de concentração: Biologia Evolutiva, 2012.

Orientador: Rogério Pincela Mateus

Co-orientador: Hamilton Cabral

Banca examinadora: Carlos Roberto Ceron, Marcos Pileggi

1. Biologia evolutiva. 2. *Drosophila* – fase larval. 3. Espécie. 4. Esterase larval. 5. EST-4. I. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Programa de Pós-Graduação Associado em Biologia Evolutiva Unicentro/UEPG. II. Título.

CDD 574.87

Orientador

Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus

Co-orientador

Prof. Dr. Hamilton Cabral

À minha maior dádiva: Natalina e José Roberto.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por minha vida.

Aos meus pais, Natalina e José Roberto, e irmãos Aline e Fernando que mesmo distantes sempre me incentivaram com suas palavras de amor, carinho e confiança, vocês são a melhor e maior dádiva de minha vida.

Ao Professor Doutor Rogério Pincela Mateus, meu orientador, pelo “acolhimento” que foi indispensável para realização deste projeto, pelo incentivo, credibilidade e confiança depositada em mim, e, sobretudo pela sua amizade, saiba que sem sua valiosa ajuda eu não teria conseguido realizar este trabalho.

Ao Professor Hamilton Cabral, pelo espaço e suporte técnico laboratorial cedido durante toda a parte experimental deste trabalho, por sua simpatia, paciência, ensinamentos e acima de tudo pela sua disponibilidade em sempre atender seus alunos.

Ao Professor Doutor Carlos Roberto Ceron, pelo empréstimo das populações de *Drosophila* utilizadas neste trabalho e à professora Maura Manfrin pelo espaço concedido em seu laboratório para manutenção das linhagens.

A todos os meus colegas de laboratório (Tecnologia Enzimática), pelo ambiente de trabalho descontraído, adorei ter conhecido todos vocês.

Aos colegas pós-graduandos, (em especial meu grande amigo Roni) que sempre têm uma palavra amiga nos momentos mais difíceis da pós-graduação.

À amiga e técnica do Laboratório de Tecnologia Enzimática, Natália Rosa, pelo empenho e dedicação em seu trabalho, e interesse pelo trabalho de todos os alunos que usam este laboratório.

Aos meus queridos amigos: Vitor, Gislaine e Andrea pelas excelentes horas de descontração, palavras amigas e companheirismo. Vocês são ótimos!

À fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Detecção da atividade esterásica em gel de poliacrilamida 10% mostrando a EST-4 parcialmente purificada obtida a partir de larvas de terceiro estágio tardio de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B).....19

**Figura 2 .** Gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) a 10% mostrando a purificação total da EST-4 obtida a partir de larvas de terceiro estágio tardio de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B)..... 20

**Figura 3.** Efeito de pH sobre a atividade (A) e estabilidade frente ao pH (B) da esterase EST-4 obtida a partir de *D. mulleri* .....22

**Figura 4:** Efeito do pH sobre a atividade (A) e estabilidade frente ao pH (B) da EST-4 obtida a partir de *D. arizonae*.....23

**Figura 5.** Efeito da temperatura sobre a atividade esterásica de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B) ..... 24

**Figura 6.** Efeito de inibidores sobre a atividade das esterases EST-4 obtidas a partir de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B).....26

**Figura 7.** Efeito de íons na atividade da esteráse EST-4 obtida a partir de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B).....28

## LISTA DE ABREVIÇÕES UTILIZADAS

$\lambda$ em	Comprimento de onda de emissão
BICINE	N,N-Bis (2-hidroxiethyl) glicina
CAPS	3-Ciclo hexilaminopropano -1-acido sulfônico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HEPES	4- (2-Hidroxiethyl) piperazina-1- acido etano sulfônico
MES	4- Ácido Morfolinoetanosulfônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TAPS	N-[tris (Hidroxiethyl) metil]-3-aminopropanosulfonato

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
Obtenção e manutenção das espécies.	13
Purificação da EST-4	14
Cromatografias de troca iônica e exclusão de massa molar.	14
Zimograma: Detecção da atividade em gel	15
Certificação da pureza das amostras.	15
Ensaio da atividade da EST-4	15
Quantificação de proteínas	16
Caracterização bioquímica funcional da EST-4	16
Efeito do pH sobre atividade e estabilidade da esterase.	17
Efeito da temperatura sobre atividade da esterase.	17
Efeito de inibidores sobre atividade esterásica.	17
Efeito de íons sobre atividade esterásica	17
Estudos de cinética enzimática	18
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
PURIFICAÇÃO DA ESTERASE LARVAL PRODUZIDA POR <i>D. mulleri</i> e <i>D. arizonae</i>	19
Cromatografia por exclusão de massa molar	19
Cromatografia por troca iônica.	20
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ESTERASE LARVAL EM <i>D. mulleri</i> e <i>D. arizonae</i> .	21
Efeito do pH sobre atividade e estabilidade da EST-4 purificada a partir de <i>D. mulleri</i> e <i>D. arizonae</i> .	21
Efeito da temperatura sobre atividade da EST-4 purificada a partir de <i>D. mulleri</i> e <i>D. arizonae</i> ..	24
Efeito de inibidores sobre a atividade da EST-4 purificada a partir de <i>D. mulleri</i> e <i>D. arizonae</i> .	25
Efeito de íons sobre atividade da EST-4 purificada a partir de <i>D. mulleri</i> e <i>D. arizonae</i> .	27

Parâmetros Cinéticos da EST-4 obtida a partir de <i>D. mulleri</i> e <i>D. arizonae</i>	29
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>33</b>

## RESUMO

Um grupo de enzimas bioquimicamente importante em insetos é o das esterases. Embora estas tenham sido extensivamente estudadas, ainda não está esclarecido o papel fisiológico da maioria delas. Neste trabalho foi feito um estudo de purificação e caracterização bioquímica da EST-4 (esterase larval) de duas espécies do grupo *Drosophila repleta*, *Drosophila mulleri* e *Drosophila arizonae*, com intuito de estabelecer parâmetros comparativos entre estas enzimas nestas espécies, a fim de verificar se há padrões bioquímicos que permitam uma diferenciação funcional das enzimas nas mesmas. Para tanto a EST-4, purificada através de cromatografias de exclusão de massa molar e troca iônica, foi submetida a ensaios bioquímicos, nos quais revelaram que em *D. mulleri* esta enzima mostrou atividade ótima na temperatura de 40 a 45°C e pH 7,5, mantendo maior estabilidade em pH alcalino, na faixa de pH 8,0-10. Foi classificada como serino esterase, uma vez que sua atividade foi inibida na presença de PMSF. Com relação ao estudo sobre efeito de íons metálicos, notou-se que nenhum íon modulou negativamente a EST-4, e o ferro foi o que maior exerceu efeito modulador positivo na atividade enzimática. O mesmo procedimento foi adotado para a EST-4 de *D. arizonae*, sendo que a mesma mostrou atividade enzimática ótima em temperatura 40°C e pH 8,0, mantendo maior estabilidade em pH ácido, na faixa de pH 5,5-6,5, e também pode ser classificada como serino esterase. Com relação ao ensaio de íons metálicos, o  $\text{Fe}^{+2}$  teve efeito contrário ao encontrado em *D. mulleri*, ou seja, atuou como modulador negativo. O  $\text{Al}^{+3}$  inibiu praticamente 100% a atividade enzimática e os íons  $\text{Na}^{+}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  tiveram efeito modulador positivo. Foram realizados estudos cinéticos investigando a influência do substrato p-nitrofenil acetato na atividade enzimática, e apesar da EST-4 de *D. mulleri* apresentar maior afinidade pelo substrato citado, a EST-4 de *D. arizonae* demonstrou maior  $V_{max}$  e eficiência catalítica em condições ideais de reação. Em suma, podemos inferir, com base nos dados da caracterização e cinética, que a EST-4 de *D. mulleri* e *D. arizonae* apresentam diferenciação funcional e bioquímica, uma vez que apresentaram propriedades distintas frente ao substrato utilizado, além de diferenças pontuais com relação aos ensaios de caracterização.

## ABSTRACT

Esterases form a group of biochemically important enzymes in insects. Although they have been extensively studied, it is still unclear the physiological role of most of them. In this work, the purification and biochemical characterization of EST-4 (larval esterase) from two species of the *Drosophila repleta* group, *Drosophila mulleri* and *Drosophila arizonae*, was performed in order to establish comparative parameters between these enzymes in these species and to check for biochemical patterns that allow a functional differentiation of enzymes in these species. Both EST-4 were purified by molecular weight exclusion and ion exchange chromatographies and were biochemically analyzed, which revealed that, in *D. mulleri*, this enzyme has optimal activity at temperatures from 40 to 45°C and pH 7.5, maintaining stability in alkaline pH in the range of pH 8.0 to 10. In this species it was classified as serine esterase, since its activity was inhibited in the presence of PMSF. The effect of metal ions revealed that no ion negatively modulated EST-4, and that iron had the most positive modulating effect exerted on this enzyme activity. For the EST-4 of *D. arizonae*, and enzyme activity showed the same optimum temperature (40°C) and pH (8.0), maintaining stability in acidic pH in the pH range from 5.5 to 6.5 and was also classified as a serine esterase. The metal ions test demonstrated that  $\text{Fe}^{+2}$  had the opposite effect that was found in this enzyme of *D. mulleri*, serving as a negative modulator. The  $\text{Al}^{+3}$  inhibited the enzyme activity almost 100% and  $\text{Na}^{+}$  and  $\text{Cu}^{+2}$  had a positive modulation effect. Kinetic studies were performed investigating the influence of substrate p-nitrophenyl acetate in enzyme activity, and despite *D. mulleri*'s EST-4 had a higher affinity for this substrate, *D. arizonae*'s showed higher  $V_{\text{max}}$  and catalytic efficiency in optimal conditions of reaction. Therefore, it can be inferred, based on the characterization and kinetic data, that the EST-4 from *D. mulleri* and from *D. arizonae* presented biochemical and functional differentiation as they showed different properties compared to the substrate used, and slight differences with respect to the characterization tests.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Grupo *repleta*

O grupo *repleta* é o maior grupo neotropical, abrangendo mais de 90 espécies, e atualmente é composto por 5 subgrupos: *repleta*, *mercatorum*, *hydei*, *mulleri* e *fasciola*. O maior é o subgrupo *mulleri*, com mais de 51 espécies descritas e praticamente todas as suas espécies usam cactáceas como local de criação (Bächli, 2011).

Wasserman (1982a) inicialmente dividiu esse subgrupo em 5 complexos de espécies aparentadas, porém atualmente existem 10 complexos de espécies neste subgrupo (Bächli, 2011). As duas espécies objeto deste estudo pertencem a dois destes complexos: *D. arizonae* ao complexo *mojavensis* e *D. mulleri* ao complexo *mulleri*. Segundo Ruiz *et al.* (1990), as espécies pertencentes à estes complexos utilizam quase 30 espécies diferentes de cactos naturais de desertos da América do Norte pelo menos durante um estágio de seu ciclo de vida.

As espécies do grupo *repleta* ocupam diferentes habitats, mas a maioria delas, incluindo *D. arizonae* e *D. mulleri*, são fitófagas, ovopositando em cladódios em decomposição de várias espécies da família Cactacea. Elas são, portanto, dependentes desses tecidos em decomposição pelo menos durante o estágio larval. As larvas se desenvolvem alimentando-se de leveduras específicas envolvidas neste processo (Barker e Starmer, 1982; Pereira *et al.*, 1983; Heed e Mangan, 1986; Barker *et al.*, 1990; Powell, 1997; Etges e Jackson, 2001; Matzkin *et al.*, 2006), de acordo com o sistema cacto-levedura-*Drosophila*. As larvas, portanto, são especialistas. Já os adultos também podem se alimentar de leveduras de cactos em decomposição, porém eles visitam outras fontes alimentares, sendo assim generalistas. Pelo fato da especificidade larval quanto ao sítio de criação, as áreas de distribuição das espécies deste grupo são dependentes da distribuição desses vegetais, acompanhando suas áreas de ocorrência (Throckmorton, 1982; Wasserman, 1982b; Tidon-Sklorz e Sene, 1995; Powell, 1997).

Insetos fitófagos apresentam-se como excelentes sistemas modelos para estudos das bases genéticas e ecológicas da adaptação e divergência populacional, uma vez que as plantas hospedeiras constituem um fator

ambiental imediato, que pode afetar estágios iniciais do ciclo de vida (Fogleman, 1982; Fogleman e Abril, 1990; Fanara *et al.*, 1999, 2004, 2006; Fanara e Hasson, 2001; Matzkin e Eanes 2003; Matzkin, 2004, 2005; Matzkin *et al.*, 2006; Carreira *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2007a, 2007b, 2008a, 2008b, 2008c, 2008d).

A exploração de uma nova planta hospedeira pode resultar em um ajuste genético com relação a uma nova fonte de alimentação, nichos quimicamente diferentes, que algumas vezes pode incluir componentes potencialmente tóxicos, novos ambientes de acasalamento, parasitóides, bactérias e fungos (Kircher, 1982; Fogleman e Abril, 1990; Via, 1990; Fogleman e Danielson, 2001).

Este tipo de alteração pode favorecer a divergência em características associadas com o desempenho em novos hospedeiros, tais como tempo de desenvolvimento, ovoposição e sobrevivência (Mitter e Futuyma, 1983; Etges, 1990; Jaenike e Holt, 1991; Fanara e Hasson, 2001; Jaureguy e Etges, 2007; Soto *et al.*, 2007a, 2008a), e sistemas sensoriais, tais como aqueles envolvidos com olfato e paladar (Dambroski *et al.*, 2005; Markow e O'Grady, 2005; McBride, 2007; Smadja e Butlin, 2008). Estas alterações são o resultado de uma série de modificações fisiológicas, incluindo aquelas relacionadas com sistemas bioquímicos associados com a adaptação ao novo ambiente.

## **1.2 Isoenzimas - esterases**

Segundo a comissão de Nomenclatura Bioquímica da IUPAC-IUB, (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry 1977), isoenzimas podem ser definidas como múltiplas formas moleculares de uma enzima que ocorrem dentro de uma única espécie e são resultado da presença de mais de um gene estrutural.

A origem destas formas moleculares múltiplas geralmente pode ser atribuída não só à presença de mais de um loco gênico, mas também a mais de um alelo em um mesmo loco. Assim, em ambos os casos, os produtos gênicos são diferentes. Por outro lado, no último caso em particular, as formas enzimáticas resultantes podem ser chamadas de aleloenzimas (ou aloenzimas, ou ainda alozimas), sendo esta classe de proteínas variantes responsável

pelos polimorfismos enzimáticos observados e mais estudados em populações naturais (Wagner *et al.*, 1974).

Um grupo de enzimas bioquimicamente importante em inseto é o das esterases. Este grupo compreende um conjunto heterogêneo de enzimas hidrolíticas amplamente distribuídas entre os seres vivos, que catalizam a hidrólise dos ésteres, além de peptídeos, amidas e haletos (Walker e Mackness, 1983).

Por apresentarem uma enorme diferenciação em seus padrões enzimáticos, as esterases têm sido amplamente utilizadas para estudos evolutivos, taxonômicos e bioquímicos, sendo que algumas delas já tiveram suas seqüências de aminoácidos estabelecidas e os genes responsáveis seqüenciados e localizados cromossomicamente (Robin *et al.*, 2000; Balakirev, 2003; Gomes e Hasson, 2003).

Em insetos, elas têm sido extensivamente estudadas, embora ainda não esteja esclarecido o papel fisiológico da maioria delas. Nesses organismos há evidências de que elas participem de diversos processos fisiológicos (Zhang *et al.*, 2010), incluindo processos digestivos (Houk *et al.*, 1979; Kapin e Ahmad, 1980; Jones e Bancroft, 1986; Sreerama e Veerabhadrapa, 1991; Argentine e James, 1995), de processos reprodutivos (Richmond e Senior, 1991; Costa *et al.*, 1983; Mane *et al.*, 1983; Scott, 1986; Karotam e Oakeshott, 1993; Karotam *et al.*, 1993), da degradação de inseticidas (Raymond *et al.*, 1993; Mutero *et al.*, 1994; Whyard *et al.*, 1994; Feyereisen, 1995), do processo de degradação de feromônios sexuais femininos após o reconhecimento pelo macho (Vogt e Riddiford, 1981), e da regulação dos níveis de hormônio juvenil (Kort e Granger, 1981; Raushenbakh *et al.*, 1991; Zera e Holtmeier, 1992; Gu e Zera, 1994).

Atualmente, a classificação aceita para as esterases é baseada na sua sensibilidade a três grupos de inibidores específicos de atividade enzimática (Holmes e Master, 1967 **apud** Oakeshott *et al.*, 1993). Com base neste critério, são diferenciadas quatro classes de esterases descritas abaixo:

- . Arilesterase - são inibidas somente por reagentes que se ligam a grupos sulfidrílicos e atuam principalmente sobre substratos aromáticos.
- . Carboxilesterases - são inibidas somente por organofosforados e sua maior afinidade é por ésteres alifáticos, geralmente ácidos de cadeias longas.

. Colinesterases - são inibidas por organofosforados e carbamatos, e atuam preferencialmente sobre substratos como ésteres de colina a outros ésteres alifáticos e aromáticos. Podem ser separadas em acetilcolinesterases e pseudocolinesterases.

. Acetilesterases - não são afetadas pelos inibidores acima citados e geralmente tem maior afinidade por substratos alifáticos, envolvendo derivados do ácido acético.

### 1.3 Esterases em *Drosophila* – EST-4 e EST-5

As esterases no gênero *Drosophila* têm recebido considerável atenção por motivo de seu alto grau de polimorfismo, sendo a EST-4 e EST-5 de *D. mojavensis* fortemente polimórficas e amplamente estudadas (Zouros *et al.*, 1981; Zouros *et al.*, 1982; Pen *et al.*, 1984; Pen *et al.*, 1986a, 1986b; Pen *et al.*, 1990; Mateus *et al.*, 2009; Mateus *et al.*, 2011). Todos estes trabalhos corroboram que ambas esterases são codificadas por dois locos gênicos estruturais independentes e são produtos de um evento de duplicação gênica. Posteriormente, houve divergência no padrão de expressão temporal e tecidual. A regulação de suas expressões ao longo do desenvolvimento foram consideravelmente diferenciadas, com a EST-4 presente somente no final do último instar larval, e a EST-5 presente em todo ciclo de vida. Com relação à distribuição tecidual, a EST-4 está presente em alta concentração na cutícula da larva e a EST-5 ocorre predominantemente na hemolinfa e no corpo gorduroso do inseto (Pen *et al.*, 1984).

EST-4 e EST-5 são classificadas como  $\beta$ -esterases, codificadas por genes pertencentes ao cluster das  $\beta$ -esterases (Oakeshott *et al.*, 1990, 1993) e normalmente têm preferência por  $\beta$ -naftil esterase, entretanto aloenzimas de EST-4 tem sido detectada com alteração de preferência para  $\alpha$ -naftil acetato (Zouros *et al.*, 1982; Pen *et al.*, 1984). Segundo Pen *et al.* (1990), diferenças na preferência de substrato têm um significado evolutivo quando a mesma indicar uma mudança na estrutura enzimática com efeito fisiológico.

As esterases EST-4 e EST-5 são inibidas respectivamente por PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), inibidor específico de serino protease, e malathion (um organofosforado). Assim, a EST-4 pode ser classificada como

acetilesterase e a EST-5 como carboxilesterase (Pen *et al.*, 1984; Mateus *et al.*, 2011).

Embora as enzimas EST-4 e EST-5 possam ser localizadas em diferentes lugares no corpo do inseto e serem expressas em períodos diferentes durante o desenvolvimento, elas são produtos da duplicação gênica, essas enzimas exibem 82% de identidade na seqüência N-terminal de aminoácidos, além de apresentarem a propriedade de formação de um heterodímero interloco entre EST-4/EST-5, observado por Zouros *et al.* (1982) e Mateus *et al.* (2011), mostrando assim que as mesmas estão relacionadas estrutural e evolutivamente (Pen *et al.*, 1986).

Corroborando a hipótese de um evento de duplicação gênica, Mateus *et al.* (2009) determinaram as massas molares de EST-4 e EST-5 em duas espécies do grupo *repleta*: *D. mojavensis* e *D. arizonae*, tendo como resultado uma variação entre 81kDa e 91kDa. Mateus *et al.* (2011) estimaram a massa molar dessas enzimas em outras quatro espécies deste grupo e chegaram em resultados muito próximos, entre 80 e 97 kDa, confirmando que estas esterases apresentam propriedades de isoenzimas verdadeiras, sendo codificadas por locos gênicos distintos.

Estudos posteriores evidenciaram que EST-4 e EST-5 de *D. mojavensis* pertencem a uma superfamília de proteínas homólogas entre si e com EST-6 e EST-P de *D. melanogaster*, revelando que estas são intimamente relacionadas, pois, apresentam semelhança de 60% na região N-terminal, além de deleções em comum perto dos resíduos 24 e 30. Entretanto, apesar desta similaridade, experimentos com reação de imunoafinidade, utilizando anticorpos formados contra estas enzimas, não detectaram reação imunológica cruzada. Assim, a diferenciação na sequência aminoacídica entre EST-6 e P de *D. melanogaster* e as esterases de *D. mojavensis* parece ser suficientemente grande para não permitir reatividade imunológica (PEN *et al.*, 1990; Collet *et al.*, 1990).

Em se falando de proteínas homólogas, (Brady *et al.*, 1990) observaram similaridade de 73% nas sequências codificadoras existente para EST-6 de *D. melanogaster* e EST-5 de *D. pseudoobscura*. Todavia estas esterases correspondentes possuem padrão de expressão tecidual e organização estrutural diferentes, pois a EST-6 de *D. melanogaster* é um monômero, exclusiva de adultos e encontrada apenas no ducto ejaculatório. Já a EST-5 de

*D. pseudoobscura* é um dímero, expresso durante todo o ciclo e é encontrado nos olhos e hemolinfa de ambos os sexos, sugerindo assim que o padrão de expressão destas esterases são controlados em nível de transcrição.

Posteriormente Brady *et al.* (1992) propuseram, com base no exposto acima e ainda na similaridade de expressão gênica durante o desenvolvimento e propriedades enzimáticas correspondentes entre estas esterases, uma história evolutiva de duplicação gênica em *Est-6* e *Est-P* (considerada como pseudogene  $\Psi Est-6$  por Balakirev e Ayala 1996) de *D. melanogaster* e *Est-5* de *D. pseudoobscura*, no qual os eventos de duplicações foram responsáveis pelo polimorfismo e homogeneização encontrado nos genes *Est-5* de *D. pseudoobscura* (King, 1998).

Em estudo de adaptabilidade em variantes enzimáticas EST-5<sup>S</sup> e EST-5<sup>F</sup> em *D. mulleri*, Thomazine (2007) verificou que não só a forma EST-5<sup>S</sup> é mais resistente a desnaturação, mas também apresentou maior atividade em altas concentrações salinas e maior produtividade em termos de descendentes, porém com relação às características cinéticas ( $V_{max}$  e  $K_m$ ) os valores registrados demonstraram que estas aloenzimas não diferem de forma significativa. Como fator concluinte, as subunidades destas aloenzimas apresentaram mesma massa molar, e segundo o autor, a migração *slow* e *fast* no gel não desnaturante é devido a diferentes cargas encontradas nas proteínas, que possivelmente sofreram mutações em seus aminoácidos e originaram estas diferenças, sendo esses dados incompatíveis com a hipótese de neutralidade para manutenção do polimorfismo no loco.

De fato, há ampla evidência indicando que, na maioria dos casos, locos enzimáticos de genes duplicados são permanentemente silenciados dentro do processo evolutivo. Alternativamente, eles têm divergido em suas propriedades enzimáticas ou em especificidade tecidual ou no tempo de expressão (Zouros *et al.*, 1982).

Segundo Catelani *et al.* (2004), a expressão temporal diferencial das esterases durante o ciclo de vida dos insetos deve ser uma resposta provavelmente à atuação de mecanismos regulatórios, os quais atuam diretamente não só na expressão gênica, como também em seus produtos finais, fazendo com que essas enzimas sejam sintetizadas na medida em que

são requeridas para as funções metabólicas que exercem no organismo durante o seu desenvolvimento.

Assim, a duplicação gênica tem sido utilizada para explicar a evolução das esterases dentro do grupo *repleta* (Zouros *et al.*, 1982; Pen *et al.*, 1990; Mateus *et al.*, 2009, 2011) e ainda, de acordo com Robin *et al.* (2009), alguns destes genes duplicados poderiam estar perdendo sua função tornando-se pseudogenes em algumas espécies do grupo, provavelmente devido a flutuação dos mesmos em respostas a mudanças no desenvolvimento e expressão destas enzimas.

Portanto, como pode ser observado, os dados sobre esterases originadas de eventos de duplicação gênica mostram que pode haver diferenciação genética (regulação da expressão, mutações na sequência de DNA, entre outras) e bioquímica (especificidade de substrato, composição de aminoácidos, entre outras) após a duplicação. Além disso, alterações genéticas e bioquímicas também ocorrem nestas enzimas entre linhagens evolutivas diferentes, bem como em espécies correlacionadas, tanto entre enzimas codificadas por genes ortólogos quanto por genes parálogos. Desta forma, torna-se importante a caracterização destas diferenças para haver uma maior compreensão dos processos envolvidos na história evolutiva destas proteínas, que são importantes fisiologicamente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral purificar e caracterizar bioquimicamente a EST-4 (também conhecida com esterase larval) em *D. mulleri* e *D. arizonae* duas espécies relacionadas pertencentes ao grupo *repleta*. Assim, poderemos estabelecer parâmetros comparativos entre as enzimas destas espécies, verificar se há padrões bioquímicos que permitam uma diferenciação funcional entre elas, o que poderá contribuir para o entendimento dos processos de diferenciação desta enzima nas espécies citadas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Purificar a EST-4, esterase produzida por larvas de terceiro estadio tardio, nas duas espécies do grupo *repleta*: *D. mulleri* e *D. arizonae*;
- Realizar ensaios de caracterização bioquímica funcional da EST-4 purificada de ambas as espécies, tais como determinar o efeito de temperatura e pH na atividade, a estabilidade de pH, o efeito de inibidores e de íons;
- Realizar estudos dos parâmetros cinéticos da EST-4 purificada em ambas as espécies;

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os materiais e métodos específicos utilizados estão descritos no capítulo correspondente ao artigo científico descrito na seção de Resultados.

### **4. RESULTADOS**

Os resultados estão organizados no capítulo correspondente ao artigo científico descrito a seguir:

#### Capítulo I

Purificação e Caracterização de uma esterase específica da fase larval em duas espécies de *Drosophila* do grupo *repleta*

## RESUMO

Um grupo de enzimas bioquimicamente importante em insetos é o das esterases. Embora estas tenham sido extensivamente estudadas, ainda não está esclarecido o papel fisiológico da maioria delas. Neste trabalho foi feito um estudo de purificação e caracterização bioquímica da EST-4 (esterase larval) de duas espécies do grupo *repleta*, *Drosophila mulleri* e *Drosophila arizonae*, com intuito de estabelecer parâmetros comparativos entre estas enzimas nestas espécies, a fim de verificar se há padrões bioquímicos que permitam uma diferenciação funcional das enzimas nas mesmas. Para tanto a EST-4, purificada através de cromatografias de exclusão de massa molar e troca iônica, foi submetida a ensaios bioquímicos, nos quais revelaram que em *D. mulleri* esta enzima mostrou atividade ótima na temperatura de 40 a 45°C e pH 7,5, mantendo maior estabilidade em pH alcalino, na faixa de pH 8,0-10. Foi classificada como serino esterase, uma vez que sua atividade foi inibida na presença de PMSF. Com relação ao estudo sobre efeito de íons metálicos, notou-se que nenhum íon modulou negativamente a EST-4, e o ferro foi o que maior exerceu efeito modulador positivo na atividade enzimática. O mesmo procedimento foi adotado para a EST-4 de *D. arizonae*, sendo que a mesma mostrou atividade enzimática ótima em temperatura 40°C e pH 8,0, mantendo maior estabilidade em pH ácido, na faixa de pH 5,5-6,5, e também pode ser classificada como serino esterase. Com relação ao ensaio de íons metálicos, o  $\text{Fe}^{+2}$  teve efeito contrário ao encontrado em *D. mulleri*, ou seja, atuou como modulador negativo. O  $\text{Al}^{+3}$  inibiu praticamente 100% a atividade enzimática e os íons  $\text{Na}^{+}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  tiveram efeito modulador positivo. Foram realizados estudos cinéticos investigando a influência do substrato p-nitrofenil acetato na atividade enzimática, e apesar da EST-4 de *D. mulleri* apresentar maior afinidade pelo substrato citado, a EST-4 de *D. arizonae* demonstrou maior  $V_{max}$  e eficiência catalítica em condições ideais de reação. Em suma, podemos inferir, com base nos dados da caracterização e cinética, que a EST-4 de *D. mulleri* e *D. arizonae* apresentam diferenciação funcional e bioquímica, uma vez que apresentaram propriedades distintas frente ao substrato utilizado, além de diferenças pontuais com relação aos ensaios de caracterização.

Palavras chaves: Espécie, esterase larval, EST-4, *Drosophila*

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies do grupo *repleta* ocupam diferentes habitats, mas a maioria delas, incluindo *D. arizonae* e *D. mulleri*, espécies estudadas neste trabalho, são fitófagas, ovopositando em cladódios em decomposição de várias espécies da família Cactacea. As larvas se desenvolvem alimentando-se de leveduras específicas envolvidas neste processo (Pereira *et al.*, 1983), de acordo com o sistema cacto-levedura-*Drosophila*. As larvas, portanto, são especialistas. Já os adultos também podem se alimentar de leveduras de cactos em decomposição, porém eles visitam outras fontes alimentares, sendo assim generalistas. Pelo fato da especificidade larval quanto ao sítio de criação, as áreas de distribuição das espécies deste grupo são dependentes da distribuição desses vegetais, acompanhando suas áreas de ocorrência (Tidon-Sklorz e Sene, 1995).

Insetos fitófagos apresentam-se como excelentes sistemas modelos para estudos das bases genéticas e ecológicas da adaptação e divergência populacional, uma vez que as plantas hospedeiras constituem um fator ambiental imediato, que pode afetar estágios iniciais do ciclo de vida (Matzkin, 2005; Matzkin *et al.*, 2006). A exploração de uma nova planta hospedeira pode resultar em um ajuste genético e bioquímico com relação a uma nova fonte de alimentação, nichos quimicamente diferentes, que algumas vezes pode incluir componentes potencialmente tóxicos, novos ambientes de acasalamento, parasitóides, bactérias e fungos (Kircher, 1982; Fogleman e Abril, 1990; Via, 1990; Fogleman e Danielson, 2001). Estas alterações são o resultado de uma série de modificações fisiológicas, incluindo aquelas relacionadas com sistemas bioquímicos associados com a adaptação ao novo ambiente.

Um grupo de enzimas bioquimicamente importante em inseto é o das esterases. Este grupo compreende um conjunto heterogêneo de enzimas hidrolíticas amplamente distribuídas entre os seres vivos, que catalisam a hidrólise dos ésteres, amidas e haletos (Walker e Mackness, 1983). Em insetos, elas têm sido extensivamente estudadas há evidências de que elas participem de processos digestivos (Argentine e James, 1995), de processos reprodutivos (Karotam *et al.*, 1993), da degradação de inseticidas (Feyereisen, 1995), do processo de degradação de feromônios sexuais femininos após o reconhecimento pelo macho (Vogt e Riddiford, 1981), e da regulação dos níveis de hormônio juvenil (Gu & Zera, 1994).

As esterases EST-4 e EST-5 de espécies do grupo *repleta* têm sido amplamente estudadas (Zouros *et al.*, 1981; Zouros *et al.*, 1982; Pen *et al.*, 1984; Pen *et al.*, 1986 a; Pen *et al.*, 1986 b; Pen *et al.*, 1990; Mateus *et al.*, 2011). Todos estes trabalhos mostram que ambas são codificadas por dois locos gênicos estruturais independentes e, provavelmente, são produtos de um evento de duplicação gênica. Posteriormente houve divergência no padrão de expressão temporal e tecidual, já que a regulação de sua expressão e a distribuição tecidual foram consideravelmente modificadas (Zouros *et al.*, 1982; Pen, *et al.*, 1984).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi realizado com o apoio e a parceria do Laboratório de Genética e Evolução da UNICENTRO, sob responsabilidade do Prof. Dr. Rogério P. Mateus, com o Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Hamilton Cabral, e com o Laboratório de Genética Evolutiva de *Drosophila* da América do Sul do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maura H. Manfrin.

### **2.1 Obtenção e manutenção das espécies**

Esta parte do trabalho foi realizada nos laboratórios de Genética e Evolução da UNICENTRO e de Genética Evolutiva de *Drosophila* da América do Sul da USP em Ribeirão Preto. As linhagens das espécies *D. mulleri* e *D. arizonae*, cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP-São José do Rio Preto, foram mantidas em garrafas de vidro de 250 mL, contendo meio de quirera-ágar, em salas de temperatura constante a 25°C, com fotoperíodo de aproximadamente 12 horas. As culturas-estoques das moscas foram mantidas por meio de repiques a cada 7 dias.

### **2.2 Purificação da EST-4.**

#### **2.2.1 Obtenção das amostras**

Além da obtenção de larvas de terceiro estadio tardio diretamente das garrafas onde linhagens de laboratório estavam sendo mantidas, foram realizados cruzamentos intraespecíficos com o intuito de se maximizar a obtenção destas larvas para as duas espécies. Para tanto, machos e fêmeas virgens foram separados e, após 7 dias, 5 casais foram colocados para cruzar em garrafas contendo o mesmo meio de cultura de manutenção das linhagens, sendo realizado um acompanhamento diário do desenvolvimento larval,

separando aquelas larvas que fossem atingindo a fase de interesse onde a EST-4 é encontrada. Um total de 10 garrafas para cada espécie foram montadas neste experimento.

As larvas obtidas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e posteriormente foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

Os extratos enzimáticos não purificados foram obtidos por maceração de 400 larvas de terceiro estágio tardio em tampão fosfato 0,1M pH 6,2 e posterior centrifugação a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram submetidos a gel de poliacrilamida não desnaturante a 10%, conforme descrito por Mateus *et al.* (2011), para a detecção da presença ou ausência da EST-4 (esterase larval).

### **2.2.2 Cromatografias de troca iônica e exclusão de massa molar.**

Após a obtenção dos extratos de cada espécie, estes foram utilizados nos processos cromatográficos. O comportamento das enzimas nos processos de purificação não é previsível, assim cada enzima exige um protocolo específico. Basicamente foram adotados procedimentos alternados ou seqüenciais de cromatografia de exclusão de massa molecular, troca iônica e afinidade, buscando um efetivo isolamento das esterases alvo.

As cromatografias de exclusão de massa molar foram realizadas utilizando a resina G-75 (GE Healthcare). A resina foi empacotada em coluna apropriada para a realização da cromatografia de exclusão de massa molar com dimensões de 100 x 4cm (altura x diâmetro) e aplicado volume de amostra (extrato das larvas) obedecendo ao volume recomendado (2-5% do volume de resina) para a resina Sephadex. A eluição das esterases foi realizada com tampão fosfato 0,1M pH 6,2.

O fluxo foi ajustado para 0,6 mL/min com auxílio de bomba peristáltica. Os eluídos foram coletados em tubos de ensaio com auxílio de coletor de frações e todas as cromatografias foram conduzidas à temperatura de 4°C, seguindo fração de 5 mL por tubo.

As frações que apresentaram atividade foram reunidas e dialisadas em tampão TAPS 20 mM pH 8,5 por 24hs a 4°C com 3 trocas. Em seguida o material dialisado foi submetido à cromatografia de troca iônica com tampão TAPS 20 mM pH 8,5. A resina Sepharose Q (GE Healthcare) foi utilizada

devido a EST-4 possuir carga negativa. As resinas foram empacotadas em colunas apropriadas para cromatografia de troca iônica (GE Healthcare).

Após a aplicação da amostra na coluna, a resina foi lavada com tampão de eluição TAPS 20 mM pH 8,5 sem NaCl, para remoção do material não ligado. Em seguida, para a eluição das proteínas ligadas foi iniciado o gradiente salino linear com variação de 0 a 2 M de NaCl, do mesmo tampão.

O fluxo foi ajustado para 1,0 mL/min com auxílio de bomba peristáltica. Os eluídos foram coletados em tubos de ensaio com auxílio de coletor de frações e todas as cromatografias foram conduzidas à temperatura de 4°C, seguindo fração de 5 mL por tubo.

### **2.2.3. Zimograma: Detecção da atividade em gel**

As amostras das diversas frações obtidas após a pré-purificação pela exclusão de massa molar (resina G-75 GE Healthcare) foram individualmente misturadas a 5ul de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 8,8; água, glicerol, azul de bromofenol) e submetidas a eletroforese em gel de poli(acrilamida) 10% de acordo com o descrito por Mateus *et al.* (2011) à voltagem constante de 110V a temperatura ambiente. Para o teste de especificidade aos substratos, os géis foram tratados com solução de coloração usual (Mateus *et al.*, 2011), utilizando  $\alpha$ - e  $\beta$ -naftil acetatos, em que os seus produtos foram corados durante duas horas pelo Fast-Blue RR, com auxílio de um agitador.

#### **2.2.3.1 Certificação da pureza das amostras**

A pureza das esterases, após a cromatografia por exclusão de massa molar e troca iônica no qual foi utilizada a Sepharose Q (GE Healthcare), foi certificada por gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 10%), segundo Laemmli (1970), no qual as amostras foram misturadas ao tampão de amostra (Tris-HCl 0,05 M pH 6,8; água, DTT, azul de bromofenol, SDS e glicerol). Esta mistura foi fervida por 5 minutos a 96°C e o gel foi corado com nitrato de prata (See e Jackowski, 1989).

### **2.3 Ensaio da atividade da EST-4**

O ensaio da atividade esterásica foi verificado através do protocolo descrito por Immanuel (2010) com algumas modificações: 25 ul de enzima, 25

ul de tampão HEPES 0,05M pH 7,0/7,5 para *D. mulleri* e *D. arizonae* respectivamente e 450 ul de substrato p-nitrofenil, sendo que a unidade de atividade esterásica equivale a um micromol de p-nitrofenil liberado por unidade de tempo (minuto) sob condição de ensaio padrão, sendo esta a quantidade de enzima requerida para causar o aumento de  $0,001A_{280nm}$  dentro das condições de reações. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. O cálculo da unidade esterásica foi feito segundo Semionato (2006), no qual a unidade de enzima é dada pela seguinte fórmula:

$$U = \frac{Abs \cdot VR}{t \cdot VE}$$

Onde:

**Abs:** absorbância 410nm

**VR:** volume da reação 500ul

**e:** coeficiente de extinção molar  $18,5mL \text{ umol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  do p-nitrofenil

**t:** tempo em minutos

**VE:** volume da enzima 25ul

## 2.4 Quantificação de proteínas

A quantificação de esterase foi determinada de acordo com método descrito por Bradford (1976), utilizando curva padrão construída com soro albumina bovina (BSA).

## 2.5 Caracterização bioquímica funcional da EST-4.

### 2.5.1 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da EST-4.

A caracterização das esterases em função do pH ótimo e estabilidade frente ao pH foi realizada com sais de tampões *Good Buffer* (Beynon e Easterby, 1996) com a abrangência de pH de 4,5 até 10,5, e variações de 0,5 unidades de pH.

A determinação do pH ótimo de atividade esterásica foi realizada em diferentes valores de pH utilizando os seguintes tampões 0,05 M: Acetato (pH 4,5 e 5,0), Mes (pH 5,5, 6,0 e 6,5), Hepes (pH 7,0, 7,5 e 8,0), Bicine (pH 8,5 e 9,0 ) e Caps (pH 9,5, 10 e 10,5). Este ensaio foi realizado de acordo com o

seguinte protocolo: 25 ul de enzima, 25 ul de tampão pH 4,5 até 10,5 e 450 ul de substrato à 40°C por 30 minutos.

A estabilidade frente ao pH foi determinada com incubação da enzima por 1 hora a 25°C nos diferentes valores de pH, posteriormente houve a adição de 450 ul de substrato e a atividade foi determinada à 40°C por 30 minutos.

#### **2.5.2 Efeito da temperatura sobre a atividade da EST-4.**

A influência da temperatura na atividade da esterase purificada foi realizada em pH ótimo e abrangência da temperatura de 25 até 55°C com variações de 5°C. A enzima pura foi misturada a 25 ul de tampão de pH ótimo e à 450 ul do substrato p-nitrofenil acetato e a atividade enzimática foi verificada procedendo incubação por 30 minutos nas respectivas temperaturas anteriormente citadas.

#### **2.5.3 Efeito de inibidores sobre a atividade da EST-4.**

A determinação da natureza do sítio ativo da esterase foi realizada segundo o protocolo descrito por Dunn (1989) com modificações. Foram utilizados os seguintes inibidores com concentração final de 5mM: PMSF, EDTA e pepstatina.

A enzima pura foi previamente misturada com 2,5 ul de cada inibidor, incubada a 40°C por 5 minutos, e posteriormente foi adicionado 22,5 ul de tampão de pH ótimo e 450 ul do substrato p-nitrofenil acetato e a atividade enzimática foi verificada incubado-se por 30 minutos à 40°C.

#### **2.5.4 Efeito de íons sobre a atividade da EST-4.**

Os efeitos dos íons metálicos sobre a atividade das esterases foram investigados pela adição de íons monovalentes com concentração final de 10mM ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , e  $\text{K}^+$ ) e divalentes com concentração final de 10mM ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ).

A enzima pura foi previamente incubada com 2,5 ul cada agente químico (íons) a 40°C por 5 minutos. Posteriormente a atividade enzimática foi iniciada

com adição de 450  $\mu$ l do substrato *p*-nitrofenil acetato e 22,5  $\mu$ l de tampão de pH ótimo a 40°C por 30 minutos.

## **2.6 Estudos de cinética enzimática para EST-4**

As cinéticas enzimáticas foram obtidas pela adição crescente de substrato *p*-nitrofenil acetato com abrangência de 0,1 a 1 mM e variações de 0,5 unidades, frente a volume fixo de enzima pura (0,01  $\mu$ g/ml) obtida por Bradford. Os experimentos foram realizados em pH ótimo a 40°C e a leitura em espectrofotômetro com absorvância de 410nm.

Os valores cinéticos de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram obtidos a partir da equação de Michaelis-Menten calculada por regressão não linear dos dados de hidrólise do substrato usando o programa Grafit versão 5.0. Foram estudados  $K_m$ ,  $K_{cat}$  e  $K_{cat}/K_m$  determinando a atividade da enzima frente ao substrato *p*-nitrofenil acetato em condições ideais de ensaio.

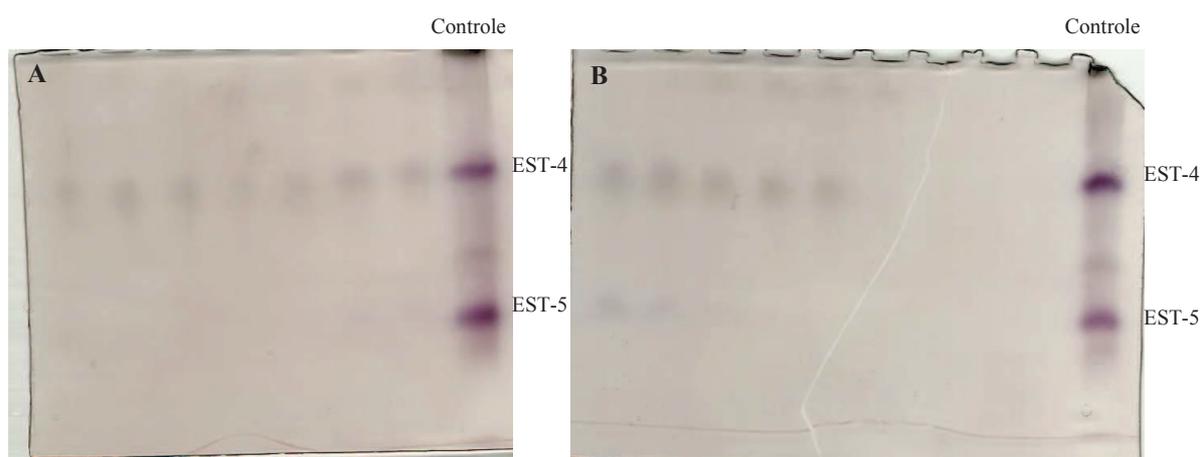
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Purificação da EST-4 obtida a partir de *D. mulleri* e de *D. arizonae*

##### 3.1.1 Cromatografia por exclusão de massa molar

Para a purificação da esterase larval foram utilizados inicialmente processos cromatográficos por exclusão de massa molar utilizando resinas Sephadex G-75. Inicialmente o extrato de enzimas originário da obtenção de amostra de larvas do terceiro estágio tardio foi macerado e em seguida o precipitado foi solubilizado em tampão fosfato 0,1M pH 6,2 e aplicado em cromatografia de exclusão de massa molar Sephadex G-75.

Nesta etapa ocorreu pré-purificação do extrato enzimático, sendo que o perfil de eluição na cromatografia revelou durante a detecção da atividade no gel de poliácridamida 10% a presença da EST-4 purificada quando comparada com o controle como mostrado na (Figura 1). Cabe ressaltar que, conforme descrito por Zouros *et al.* (1982), Pen *et al.* (1984) e Mateus *et al.* (2011), a EST-4 de *D. mulleri* demonstrou preferência pelo  $\beta$ -naftil acetato, tendo neste caso coloração rosa como corroborado no presente experimento de purificação demonstrado na figura abaixo.



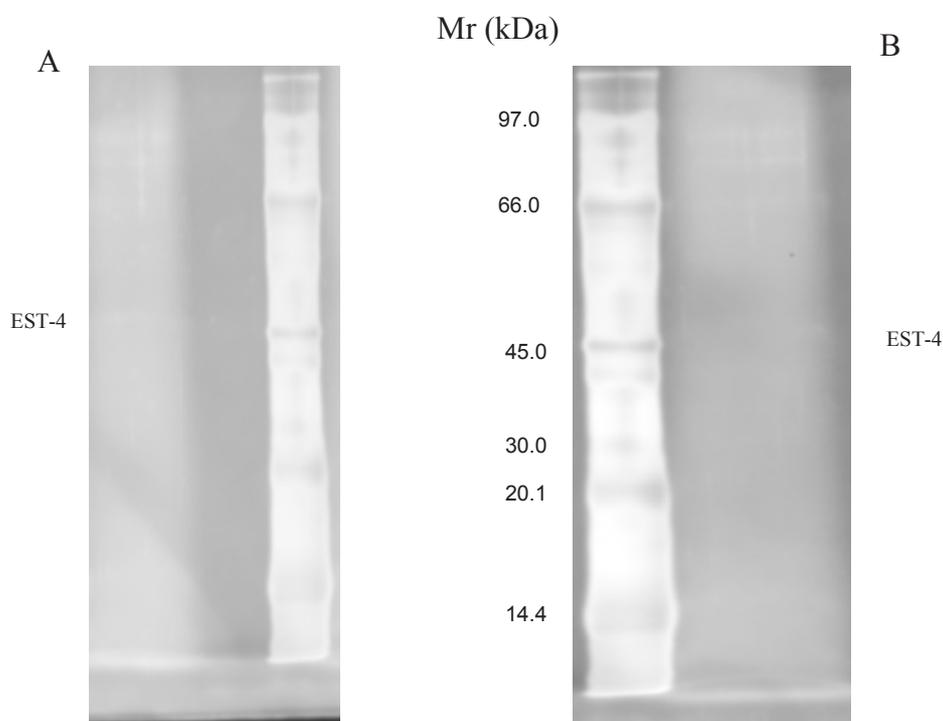
**Figura 1.** Detecção da atividade esterásica em gel de poliácridamida 10% mostrando a EST-4 parcialmente purificada obtida a partir de larvas de terceiro estágio tardio de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B).

Conforme pode ser observado na figura acima a EST-4 de *D. mulleri* e *D. arizonae* tem preferência pelo substrato  $\beta$ -naftil acetato adquirindo coloração rosa.

Com base neste resultado foram escolhidas as frações nas quais estavam presentes a enzima e preparado um gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% para certificação da purificação da enzima. Tais resultados revelaram a purificação parcial da EST-4 demonstrando a necessidade da utilização de outro método adicional, foi realizado então a troca iônica.

### 3.1.2. Cromatografia por troca iônica

Para a purificação total da esterase larval foram realizados processos cromatográficos por troca iônica utilizando Sepharose Q com diferentes gradientes de concentrações de NaCl para sua eluição. As análises das frações obtidas em cada processo cromatográfico foram realizadas através de eletroforese em gel não desnaturante para identificação da EST-4 e posteriormente a purificação foi certificada através do gel SDS-PAGE 10%, conforme demonstrada na Figura 2.



**Figura 2 .** Gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) a 10% mostrando a purificação total da EST-4 obtida a partir de larvas de terceiro estágio tardio de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B).

Utilizando o marcador protéico de massa molar por (GE Healthcare) foi possível determinar a massa molar da EST-4 e de acordo com a figura acima é possível observar que a massa molar da EST-4 purificada de *D. mulleri* e *D. arizonae* é de aproximadamente 45kDa.

### **3.2 Caracterização bioquímica da EST-4 em *Drosophila mulleri* e *D. arizonae*.**

#### **3.2.1 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da EST-4 obtida a partir de *Drosophila mulleri* e *D. arizonae*.**

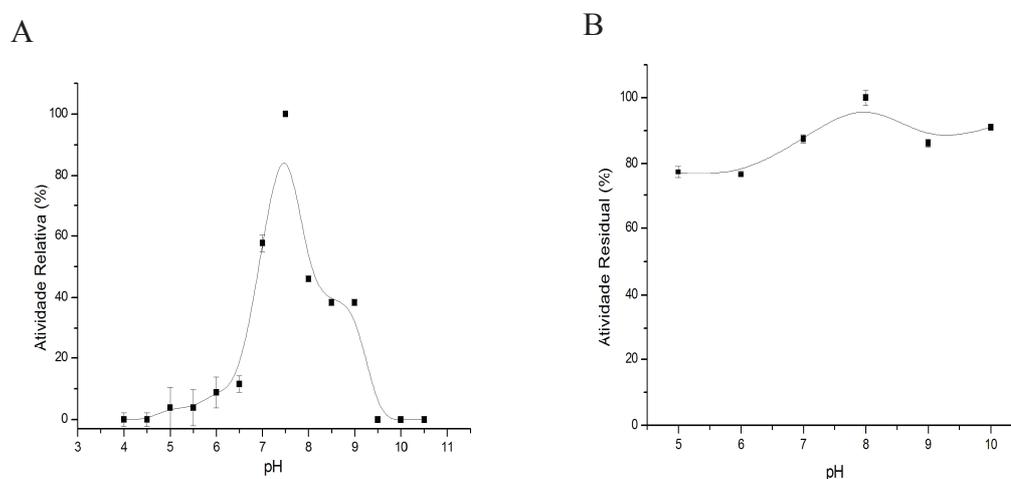
##### **3.2.1.1 *Drosophila mulleri***

A EST-4 obtida a partir de larvas de terceiro estágio tardio foi submetida a diferentes tampões na faixa de pH 4,5-10,5 para a avaliação do efeito do pH na atividade e estabilidade da mesma.

A reação foi realizada a 40°C e o perfil de atividade, segundo a variação de pH, mostrou que a esterase larval possui atividade com tendência alcalina, sendo que o pH ótimo de atividade esterásica foi 7,5 (Figura 3-A), ou seja este valor de pH foi responsável pelo estado de melhor conformação estrutural da enzima e conseqüentemente melhor performance catalítica. O contrário foi observado em pHs ácidos, sendo os mesmos responsáveis pela menor atividade. Cabe ainda salientar a sensibilidade desta esterase frente à mudança de pH, visto que, conforme podemos observar na Figura 3-A, sua atividade cai em quase 60% do pH 7,5 para o pH 8,0 e esta reduziu-se drasticamente em pH inferiores a 6,5.

No estudo da estabilidade de pH, a EST-4 apresentou menor atividade esterásica em pH ácido, retendo aproximadamente 80% de sua atividade no intervalo pH 5,0 – 6,5 (Figura 3 - B). No entanto, foi observado que o aumento de pH foi acompanhado de um aumento na atividade, sendo que a enzima

apresentou maior estabilidade em pH alcalino, principalmente na faixa de de pH 8 a 10.



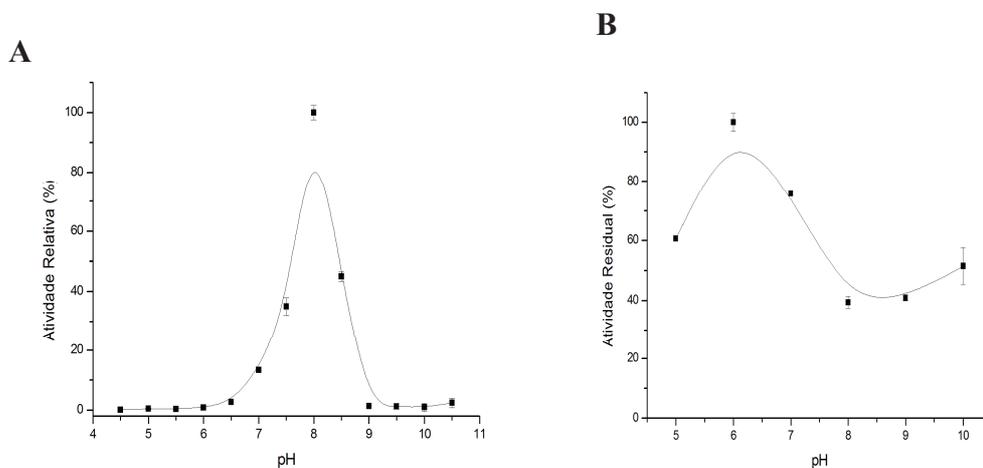
**Figura 3.** Efeito de pH sobre a atividade (A) e estabilidade frente ao pH (B) da esterase EST-4 obtida a partir de *D. mulleri*

### 3.2.1.2 *Drosophila arizonae*

A esterase produzida por larvas de terceiro estágio tardio de *D. arizonae* foi submetida a diferentes tampões na faixa de pH 4,5-10,5 para a avaliação do efeito do pH na atividade e estabilidade da mesma. A reação foi realizada a 40°C e o perfil de atividade, segundo a variação de pH, mostrou que a esterase larval possui atividade com tendência alcalina, sendo que o pH ótimo de atividade proteolítica foi pH 8,0 (Figura 4 – A). Aqui também cabe salientar a sensibilidade da EST-4 frente a mudanças de pH, visto que sua atividade é máxima em pH 8,0 e cai bruscamente em pH 8,5 e em pH 9,0 tende a zero, além disso também observou-se que atividade da mesma é drasticamente reduzida em pH's inferiores a 7,0.

No estudo da estabilidade frente ao pH (Figura 4 – B), a EST-4 apresentou menor estabilidade esterásica em pH alcalino, retendo aproximadamente 40% de sua atividade residual no intervalo pH 8,0–10, onde pode ser notado que o aumento de pH foi acompanhado de uma diminuição em sua estabilidade enzimática. Por outro lado, podemos dizer que a enzima

apresentou maior estabilidade em pH ácido, principalmente na faixa de pH de 5,5 – 6,5, nos quais sua atividade foi de aproximadamente 80%, e a partir do pH 7,0 começou a diminuir.



**Figura 4:** Efeito do pH sobre a atividade (A) e estabilidade frente ao pH (B) da EST-4 obtida a partir de *D. arizonae*.

Com base no exposto acima se pode inferir que, com relação ao pH, as EST-4 de ambas espécies possui uma curva de pH ótimo semelhante, no qual a máxima atividade é atingida em pH 7,5 para *D. mulleri* e pH 8,0 para *D. arizonae*. Porém, com relação à estabilidade de pH, o que se observou foi que em *D. mulleri* a EST-4 demonstrou maior estabilidade em pH alcalino (na faixa de pH 8,0 a 10), além de sua atividade aumentar conforme o aumento de pH, fato este não observado em *D. arizonae*, onde a atividade da EST-4 apresentou maior estabilidade em pH ácido (na faixa de pH 5,5 a 6,5), e que o aumento de pH foi responsável pela diminuição de sua estabilidade enzimática.

Em trabalho envolvendo a espécie *D. mulleri*, Thomazine (2007) estudou variantes enzimáticas da EST-5, enzima codificada pelo gene parálogo ao que codifica a EST-4 e produtos de uma duplicação gênica, encontrou para ambas aloenzimas EST-5<sup>F</sup> e EST-5<sup>S</sup>, um perfil de pH parcialmente semelhante aos resultados aqui obtidos, com atividade máxima na faixa alcalina e menor atividade em pHs ácidos, porém cabe ressaltar que a EST-4 de *D. mulleri* foi mais estável em pH's ácidos que *D. arizonae*.

Em estudo de caracterização de esterase do hormônio juvenil (JHE) em *D. melanogaster*, o pico de maior atividade para esta enzima foi encontrado na faixa de pH 6,0-8,6, no qual o aumento do pH foi proporcionalmente direto ao

aumento da atividade enzimática, e por outro lado, em pH ácido não houve hidrólise enzimática pelo JHE (Campbell *et al.*, 1992).

### 3.2.2 Efeitos da temperatura sobre a atividade da EST-4 de *D. mulleri* e *D. arizonae*.

Em *D. mulleri*, o efeito da temperatura na atividade esterásica foi estudado em pH 7,0. A atividade foi realizada na faixa de temperatura de 25 à 55°C, sendo a temperatura ótima para EST-4 de *D. mulleri* alcançada aproximadamente no intervalo de 40 – 45°C (Figura 5 - A). Nesta espécie ainda pode ser observado que o perfil de atividade esterásica produzida mostrou acentuado decréscimo em sua atividade quando incubada em temperaturas acima da temperatura ótima.

Já em *D. arizonae*, o efeito da temperatura na atividade esterásica foi estudado em pH 7,5. A atividade foi realizada na faixa de temperatura de 25 à 55°C, sendo a temperatura ótima alcançada aproximadamente em 40°C (Figura 5 – B). Nesta espécie, foi detectado que o perfil de atividade da EST-4 mostrou acentuado decréscimo em sua atividade quando incubada em temperaturas acima da temperatura ótima de 40°C.

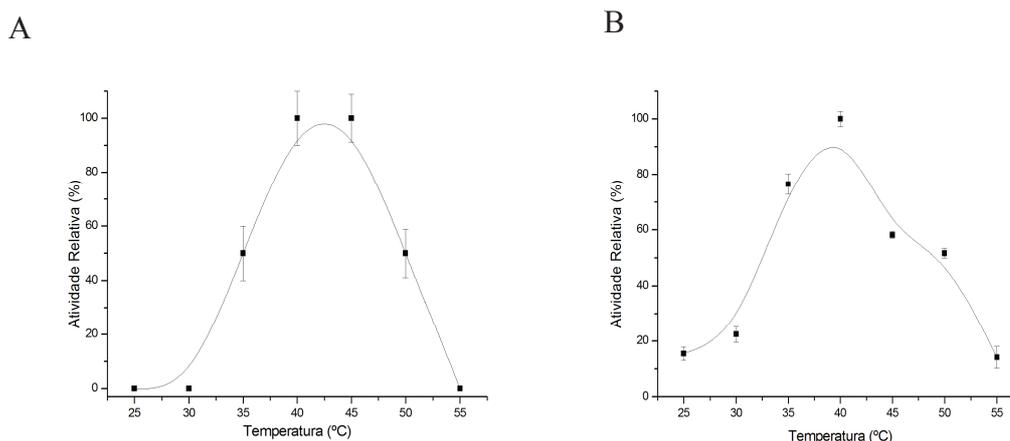


Figura 5. Efeito da temperatura sobre a atividade esterásica de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B)

Ambas as esterases apresentaram pico de atividade máxima aproximadamente em torno de 40°C, e atividade relativa tendendo a zero quando incubadas a 55°C. Porém, foi observado que a EST-4 de *D. mulleri*

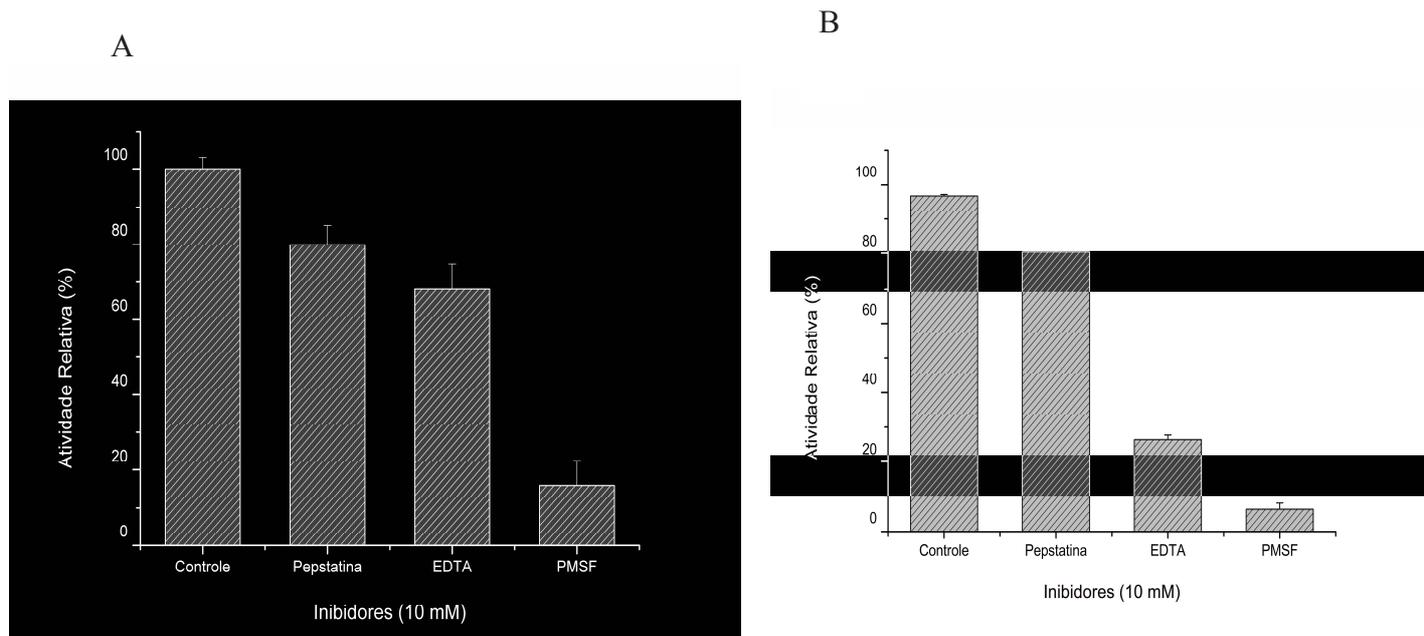
atua em temperaturas superiores quando comparada a *D. arizonae*. Tal fato é evidenciado pela atividade enzimática de quase 100% em 45°C na primeira espécie, sendo que em *D. arizonae* esta mesma temperatura foi responsável por diminuir em aproximadamente 50% a catálise enzimática da enzima.

Experimentos de temperatura obtidos por Thomazine (2007) demonstraram que as variantes da EST-5 de *D. mulleri* apresentaram maior atividade relativa em 50°C, entretanto quando as mesmas foram incubadas por 10 minutos em 55°C não foi detectada nenhuma atividade para uma das variantes - EST-5<sup>F</sup>.

Em estudo de fisiologia molecular digestiva em espécie de *Musca domestica* (Diptera), Padilha (2009) investigou o efeito da temperatura sobre a atividade de uma enzima lipolítica recombinante, e obteve dados semelhantes ao encontrado neste trabalho. A máxima catálise enzimática pelo substrato pNP-miristato foi observada a 42°C, e a metade da atividade relativa foi em torno de 53°C.

### **3.2.3 Efeito de inibidores sobre a atividade da EST-4 purificada a partir de *D. mulleri* e *D. arizonae*.**

Para classificação da natureza química do sítio catalítico foi estudado o efeito de inibidores sobre a atividade da EST-4 nas duas espécies com a incubação das enzimas na presença de inibidores, para assim investigar o principal resíduo que compõe o sítio ativo da mesma. Nos dois casos os resultados demonstraram que a maior redução da atividade esterásica foi ocasionada por PMSF, ficando em aproximadamente 35% para a enzima de *D. mulleri* (Figura 6 – A) e em 90% para a de *D. arizonae* (Figura 6 – B). Isto sugere que a EST-4 das duas espécies pertencem à classe de serino esterases. Segundo Zhou (1994), as serinos catalisam a hidrólise de amidas e estéres através de ligação covalente estér, que por sua vez é formada entre a porção acil do substrato e o resíduo de serino do sítio ativo dessas enzimas.



**Figura 6.** Efeito de inibidores sobre a atividade das esterases EST-4 obtidas a partir de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B).

Após análise dos gráficos apresentados na Figura 6, foi possível perceber que apesar de ambas as enzimas ser inativadas na presença de PMSF, houve diferença em termos de atividade relativa com relação ao mecanismo de inativação esterásica frente a este inibidor em ambas as espécies, com a EST-4 de *D. arizonae* apresentando uma redução muito mais acentuada da atividade enzimática quando exposta ao PMSF do que a EST-4 de *D. mulleri*.

Tais resultados corroboram com o anteriormente descrito por Mateus *et al.* (2011), onde a EST-4 de seis espécies pertencentes ao grupo *Drosophila repleta*, incluindo as duas estudadas aqui foi inibida por fenilmetilsulfonila (PMSF). De acordo com Dunn (1989) esta inibição deve ocorrer provavelmente pelo fato deste composto se ligar a hidroxila da cadeia lateral do resíduo de serina, sendo esta ligação irreversível e, portanto capaz de impedir a catálise enzimática, demonstrando assim a sensibilidade desta enzima frente ao inibidor citado.

Com respeito ao EDTA, foi detectado que ele foi responsável pela inibição em aproximadamente 70% da atividade da EST-4 de *D. arizonae* e apenas de 35% na de *D. mulleri*, demonstrando assim que estas esterases devem ter sua atividade modulada em presença de íons metálicos, os quais

foram possivelmente quelados na presença deste inibidor, resultando na queda acentuada observada. Já a pepstatina foi responsável pela redução da atividade enzimática da EST-4 em aproximadamente 20% para ambas as espécies, muito provavelmente este inibidor tenha se ligado ao aspartato que compõe a conservada tríade catalítica comum às serinos, afetado este resíduo provocando assim redução na atividade esterásica, uma vez que a atividade enzimática das serinos é indiretamente reforçada pelas interações dos resíduos vizinhos: histidina e aspartato que compõem sua tríade catalítica (Zhou *et al.*, 1994).

No entanto, em estudo de identificação e caracterização bioquímica de esterases em insetos da espécie *Tribolium castaneum* (carunchos), Aparecida *et al.* (2011) verificaram a atividade enzimática com a utilização de inibidores e observou que nenhuma enzima foi inibida por PMSF, e sim por sulfato de eserina ou malathion, sendo portanto classificadas como colinesterases e carboxilesterases, respectivamente.

Em estudo semelhante Hinton (2003), caracterizou bioquimicamente a esterase do hormônio juvenil (JHE) de *Manduca sexta*, sendo o PMSF responsável pela inibição deste hormônio *in vitro*. Além disso, entre os inibidores utilizados pelo autor, somente o PMSF exerceu efeito de inibição na atividade.

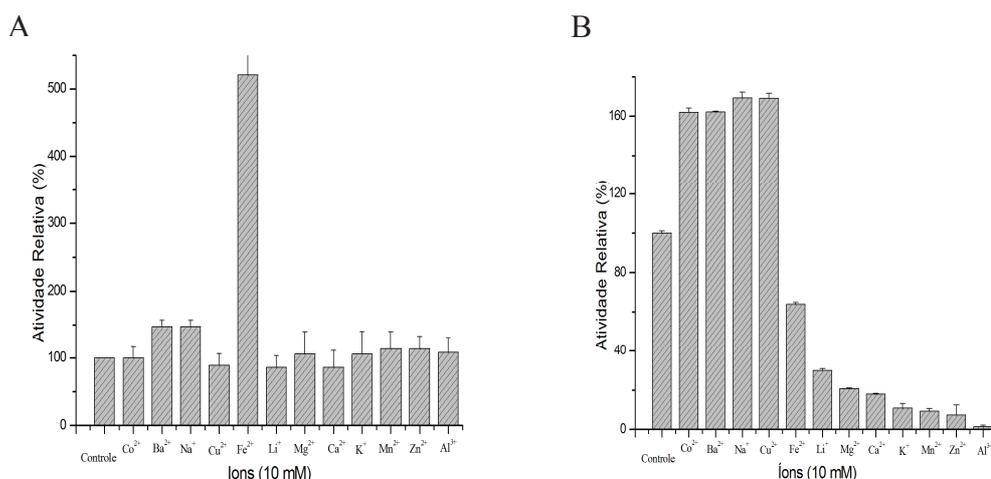
#### **3.2.4 Efeito de íons sobre a atividade da EST-4 purificada a partir de *D. mulleri* e *D. arizonae*.**

Os íons metálicos podem ser determinantes na organização molecular da proteína e influenciar sua atividade e estabilidade enzimática pois os mesmos podem atuar como cofatores. No estudo sobre o efeito de íons metálicos na atividade da EST-4 de *D. mulleri* (Figura 7 – A) foi observado que o íon  $\text{Fe}^{+2}$  apresentou um elevado efeito ativador da atividade, praticamente 400% quando comparado ao controle. Este fato pode ser justificado sabendo-se que íons ligam-se a aminoácidos, e assim influenciam na conformação estrutural da proteína, e com isso podem melhorar ou piorar sua conformação, influenciando diretamente no exercício catalítico da enzima (Merheb-Dini *et al.*, 2009). Neste caso, pode ser proposto que a ligação do  $\text{Fe}^{+2}$  melhorou a

atividade enzimática, possivelmente tornando a EST-4 melhor organizada estruturalmente.

Ainda em *D. mulleri*, os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ba}^{+2}$  apresentaram um efeito ativador em torno de 50%. Provavelmente tais íons atuaram como cofatores ligando-se em local próximo ou no próprio sítio ativo da EST-4 facilitando a função catalítica da mesma. Os íons  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Li}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  não influenciaram na atividade enzimática da EST-4 nesta espécie quando comparados ao controle, ou seja, não apresentaram efeito modulador da atividade. Os demais íons promoveram um leve efeito ativador na atividade enzimática. Cabe salientar que nenhum dos íons metálicos utilizados neste ensaio teve efeito modulador negativo sob a ação esterásica.

No caso de *D. arizonae* observou-se que os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cu}^{+2}$  foram responsáveis pela ativação da enzima em quase 70%, seguidos dos íons  $\text{Co}^2$  e  $\text{Ba}^{+2}$  (Figura 7 – B). Por outro lado, foi verificado que os íons  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  diminuíram a atividade esterásica comparada ao controle, especialmente o  $\text{Al}^{+3}$  que inibiu praticamente 100% a atividade desta enzima. Partindo do pressuposto que os íons podem influenciar na atividade enzimática ao se ligarem a resíduos catalíticos ou a aminoácidos da enzimas, estes resultados sugerem que este íon muito possivelmente se ligou na cadeia lateral do resíduo de serina que compõe a tríade catalítica comum à serino, promovendo assim efeito modulador negativo, impedindo que a enzima exercesse sua função catalítica.



**Figura 7.** Efeito de íons na atividade da esteráse EST-4 obtida a partir de *D. mulleri* (A) e *D. arizonae* (B).

Dado semelhante foi obtido por Silva (2011), no qual a serino protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius, durante ensaio de íons metálicos, teve sua atividade reduzida em torno de 80% na presença do  $Al^{+3}$ , sendo este entre todos os íons testados o maior responsável pelo efeito modulador negativo.

Um fato interessante a ser destacado é o efeito modulador que o  $Fe^{+2}$  teve nas duas espécies estudadas. O mesmo foi responsável por uma acentuada ativação da EST-4 em *D. mulleri* e, no entanto foi capaz de exercer efeito modulador negativo em *D. arizonae*, diminuindo aproximadamente em 40% a atividade esterásica. Além disso, o  $Al^{+3}$  também teve um efeito modulador diverso em ambas as enzimas, pois o mesmo não apresentou nenhum efeito modulador (positivo/negativo) sob a EST-4 de *D. mulleri*, todavia foi responsável praticamente pela inibição total da EST-4 em *D. arizonae*.

Assim, a partir dos resultados obtidos neste ensaio, pode ser sugerido que, apesar de serem enzimas codificadas por genes parálogos com expressão tecidual e temporal idênticas, elas podem ser consideradas bioquimicamente distintas quanto a sua catálise, especialmente no que tange a presença de ferro e alumínio visto que o efeito modulador de ambos na atividade enzimática foi diferente.

### **3.3 Parâmetros cinéticos da EST-4 obtida a partir de *D. mulleri* e *D. arizonae***

Um parâmetro de interesse particular no estudo enzimático é a constante de *Michaelis Menten*  $K_m$ , pois a mesma expressa a afinidade que uma enzima apresenta pelo seu substrato, onde existirá uma determinada concentração de substrato que provocará um estado no qual a enzima atingirá metade de sua velocidade máxima, sendo que quanto menor o  $K_m$  maior a afinidade da enzima pelo substrato (Lehninger, 2007).

Em se falando de atividade catalítica, cabe salientar que os parâmetros cinéticos são peculiares e intrínsecos de cada relação enzima/substrato, ou seja, dependem da especificidade enzimática, e atualmente se observa que os estudos a respeito de dados cinéticos são escassos e pouco descritos,

especialmente no que tange esterases de *Drosophila* e o substrato utilizado neste trabalho.

Ao contrário do estudo feito neste trabalho, no qual foram obtidos dados cinéticos da esterase larval, EST-4, utilizando como substrato o p-nitrofenil acetato, outros autores têm realizado experimentos de determinação de parâmetros cinéticos de esterases, contudo com substrato diferente do já citado (Campbell *et.al.*, 1998; Zera *et. al.*, 2002).

Em estudo de purificação e caracterização desenvolvido por Zera *et. al.*, (2002), o hormônio juvenil (JHE) presente em *Gryllus assimilis* hidrolisou ambos substratos: o  $\alpha$  naftil e p nitrofenil éster, e segundo autor o JHE provavelmente consegue hidrolizar cadeias alifáticas longas de ésteres. Por outro lado Campbell *et. al.*, (1998) verificaram em estudo de purificação e caracterização cinética que o JHE de *Drosophila melanogaster* hidrolisou apenas o substrato  $\alpha$  naftil acetato.

No presente trabalho foram realizados estudos cinéticos investigando a influência do substrato p-nitrofenil acetato na atividade da EST-4. Os resultados estão apresentados na Tabela 1, onde pode ser observado *D. mulleri* apresentou maior afinidade para o substrato utilizado do que a espécie relacionada pertencente ao mesmo grupo, *D. arizonae*. O  $K_m$  da EST-4 na primeira espécie é bem menor (0,17mM) do que na segunda (0,74mM), revelando, assim, que a concentração de p-nitrofenil acetato para que a enzima atinja metade da sua velocidade máxima em *D. mulleri* é menor do que em *D. arizonae*.

Entretanto, cabe ressaltar que embora a afinidade da EST-4 por este substrato em *D. mulleri* seja maior, percebe-se que sua velocidade máxima é bem inferior quando comparada a encontrada em *D. arizonae*, sendo que nesta a  $V_{max}$  foi aproximadamente 20 vezes superior (19,33mM/min<sup>-1</sup>), proporcionando assim uma maior eficiência catalítica frente ao substrato p-nitrofenil acetato.

Com relação ao número de ciclos reacionais executados por unidade de tempo,  $k_{cat}$ , foi possível inferir que a EST-4 de *D. arizonae* consegue converter o substrato em produto com maior eficiência (1933 min<sup>-1</sup>) quando comparada com a atividade desempenhada pela EST-4 de *D. mulleri* (94,54 min<sup>-1</sup>).

A partir dos valores obtidos de  $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $k_{cat}$ , foi realizado o cálculo de eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) e os resultados obtidos (Tabela 1) corroboraram que a esterase produzida por *D. arizonae* apresentou maior eficiência catalítica ( $2583,8 \text{ mM}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) quando comparada a esterase produzida por *D. mulleri* ( $532 \text{ mM}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) frente ao substrato p-nitrofenil em condições ideais de reação.

Assim, o conjunto de dados de caracterização e cinética produzidos neste trabalho possibilitaram a inferência de que as EST-4 destas duas espécies são funcionalmente diferentes, uma vez que apresentaram propriedades bioquímicas distintas nos experimentos de caracterização e de cinética frente ao substrato utilizado.

**Tabela 1.** Parâmetros cinéticos para hidrólise do p-nitrophenil acetato pela EST-4

<b>Espécie</b>	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
<i>D. mulleri</i>	<b>0,17</b>	<b>0,94</b>	<b>94,54</b>	<b>532</b>
<i>D. arizonae</i>	<b>0,74</b>	<b>19,33</b>	<b>1933</b>	<b>2583,8</b>

#### 4. Conclusões

A partir deste trabalho foi possível elucidar, através de parâmetros de caracterização bioquímica e cinética, as diferenças entre a esterase larval (EST-4) em duas espécies do grupo *Drosophila repleta*: *D. mulleri* e *D. arizonae*. Estes parâmetros indicaram que, apesar da expressão temporal e tecidual ser igual para ambas as enzimas, as mesmas podem ser consideradas funcionalmente diferentes com relação a algumas características bioquímicas e funcionais.

A EST-4 de *D. mulleri* apresentou atividade enzimática ótima em temperatura de 43°C e pH 7,5, mantendo-se mais estável em pH alcalino, na faixa de pH 8,0-10. Por outro lado a EST-4 de *D. arizonae* apresentou atividade enzimática ótima em temperatura 40°C e pH 8,0, com maior estabilidade em pH ácido, na faixa de pH 5,5-6,5. Ambas as enzimas foram classificadas como serino esterases uma vez que tiveram sua atividade inibida na presença de PMSF. Porém, este inibidor teve um efeito maior sobre a atividade enzimática de *D. arizonae*.

No estudo sobre efeito de íons metálicos notou-se que em *D. mulleri* o ferro foi o que maior exerceu efeito modulador positivo sobre a EST-4. Por outro lado, o mesmo foi responsável por um efeito modulador negativo de 40% sobre a EST-4 de *D. arizonae*, enquanto os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cu}^{+2}$  tiveram efeito modulador positivo sobre a mesma. Cabe ressaltar que nenhum íon modulou negativamente a EST-4 em *D. mulleri*, enquanto que os íons,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  diminuíram a atividade esterásica em *D. arizonae*, especialmente o  $\text{Al}^{+3}$ , que inibiu praticamente 100% a atividade desta enzima.

Com respeito aos dados cinéticos, embora a EST-4 de *D. mulleri* tenha apresentado maior afinidade pelo substrato p-nitrofenil acetato, a EST-4 de *D. arizonae* apresentou não só maior  $V_{max}$ , mas também maior eficiência catalítica frente a este substrato em condições ideais de reação.

## 5. Referências Bibliográficas:

- APARECIDA, A. S. G., MONEZI A. L. L. Identificação e caracterização das esterases *Tribolium castaneum* (Coleoptera: TENEBRIONIDAE). *SaBios Rev. Saúde e Biol.*, v.6, n.1, p.25-35, jan./abr., 2011.
- ARGENTINE, J.A., JAMES, A.A., Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v.25, n.5, p.621-630, 1995.
- BÄCHLI, G. Taxodros: The database on taxonomy of Drosophilidae. 2011. Disponível em: <<http://www.taxodros.unizh.ch/>> Acessado em dezembro de 2011.
- BALAKIREV, E. S., AYALA. F. Is Esterase-P Encoded by a Cryptic Pseudogene In *Drosophila melanogaster*?. *Genetics*, v.144, 1511-1518, 1996.
- BALAKIREV, E. S., CHECHETKIN V. R., LOBZIN V. V., AYALA. F., DNA Polymorphism in the  $\beta$ -Esterase Gene Cluster of *Drosophila melanogaster* *Genetics* v.164: 533–544, 2003.
- BARKER, J. S. F., STARMER, W. T. Ecological genetics and evolution: the cactus-yeast-*Drosophila* system. *Academic Press*, North Ryde, New South Wales, Australia, 1982.
- BARKER, J. S. F., STARMER, W. T., MACINTYRE, R. J. Ecological and evolutionary genetics of *Drosophila*. *Plenum*, New York, 1990.
- BEYNON, R. J. and EASTERBY, J. S. Buffer solutions Oxford University, New York, p. 67-82, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADY, J.P., & RICHMOND, R.C. An evolutionary model for the duplication and divergence of esterase genes in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, v. 34, pp. 506-521, 1992.
- BRADY, J.P., RICHMOND, R.C., & OAKESHOTT, J.G. Cloning of the esterase-5 locus from *Drosophila pseudoobscura* and comparison with its homologue in *D. melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 7, pp. 525-546, 1990.

- CATELANI, A.R.A.L.; CERON, C.R.; BICUDO, H.E.M. Variation of genetics expresión during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Biochemical genetics*, New York, v. 42, n. 3-4, p. 69-84, 2004.
- CAMPBELL P. M., HEALY M. J. OAKESHOTT J. G., Characterisation of juvenile hormone esterase in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* v. 22, No. 7, pp. 665~77, 1992
- CAMPBELL P.M.; OAKESHOTT J.G.; HEALY M. J. Purification and kinetic characterisation of juvenile hormone esterase from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* v.28, 501–515, 1998.
- CARREIRA, V. P., SOTO, I. M., HASSON, E., FANARA, J. J. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *J. Evol. Biol.*, v.9, p.1275-1282, 2006.
- COLLET, C., NIELSEN, K.M., RUSSELL, R.J., KARL, M., OAKESHOTT, J.G., & RICHMOND, R.C. Molecular analysis of duplicated esterase genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 7, pp. 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. Genetics*, v.21, n.1/2, p.191-197, 1983.
- DAMBROSKI, H. R., LINN, C., BERLOCHER, S., FORBES, A. A., ROELOFS, W., FEDER, J. L. The genetic basis for fruit odor discrimination in *Rhagoletis* flies and its significance for sympatric host shifts. *Evolution*, v.59, p.1953–1964, 2005.
- DUNN, B. M. Determination of protease mechanism. BEYNON, R. J.; BOND, J. S. *Proteolytic Enzymes: a practical approach*. Great Britain: IRL Press, p. 57-81, 1989.
- ETGES, W. J. Direction of life-history evolution in *Drosophila mojavensis*. *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila* (J. S. F. Barker, W. T. Starmer e R. J. MacIntyre, eds.), pp. 37–56, 1990.
- ETGES, W. J, JACKSON, L. L. Epicuticular hydrocarbon variation in *Drosophila mojavensis* cluster species. *J. Chem. Ecol.*, v.27, p.2125-2149, 2001.

- FANARA, J. J., HASSON, E. Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. *Evolution*, v.55, p.2615–2619, 2001.
- FANARA, J. J., FONTDEVILA, A., HASSON, E. Oviposition preference, viability, developmental time and body size in the cactophilic sibling species *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association to their natural hosts. *Evol. Ecol.*, v.13, p.173-190, 1999.
- FANARA, J. J., MENSCH, J., FOLGUERA, G., HASSON, E. Developmental time and thorax length differences between the cactophilic species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* reared in different natural hosts. *Evol. Ecol.*, v.18, p.203-214, 2004.
- FANARA, J. J., FOLGUERA, G., FERNÁNDEZ-IRIARTE, P., MENSCH, J., HASSON, E. Genotype by environment interactions in viability and developmental time in populations of cactophilic *Drosophila*. *J. Evol. Biol.*, v.9, p.900-908, 2006.
- FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol. Lett.*, v.82-83, p.83-90, 1995.
- FOGLEMEN, J. C. The role of volatiles in the ecology of cactophilic *Drosophila*. *Ecological genetics and evolution: the cactus-yeast-Drosophila model system*. (J. S. F. Barker e W. T. Starmer, eds.), p.191-206, Academic Press, 1982.
- FOGLEMEN, J. C., ABRIL, J. R. Ecological and evolutionary importance of host plant chemistry. *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila* (J. S. F. Barker, W. T. Starmer e R. MacIntyre, eds.), p. 121-143, 1990.
- FOGLEMEN, J. C., DANIELSON, P. B. Chemical interactions in the cactus-microorganism-*Drosophila* model system of the Sonoran desert. *Am. Zool.*, v.41, p.877-889, 2001.
- GOMES G. A., HASSON E. Transpecific Polymorphisms in an Inversion Linked Esterase Locus in *Drosophila buzzatii*. *Mol Biol Evol* 20 410-423, 2003.
- 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

- HEED, W. B., MANGAN, R. L. Community ecology of Sonoran Desert *Drosophila*. *The genetics and biology of Drosophila* (M. Ashburner, H. Carson e J. N. Thompson, eds.), p.311-345, Academic Press, , 1986.
- HINTON A. C., HAMMOCK B. D., In vitro expression and biochemical characterization of juvenile hormone esterase from *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33 p. 317–329, 2003.
- HOUK, E.J., CRUZ, W.J., HARDY, J.L. Further characterization of the nonspecific esterases of the mosquito, *Culex tarsalis* coquillett. *Insect Biochem.*, v.9, n.5, p.429-434, 1979.
- IMMANUEL,G. P. ESAKKIRAJ AND A. PALAVESAM . Solid state production of Esterase using groundnut oil cake by fish intestinal isolate *Bacillus circulans*. *KKU 15 (5)*, 2010.
- IUPAC - IUB COMMISSION on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of multiple forms of enzymes. Recommendations (1976). *J. Biol. Chem.*, v.252, p.5939-5941, 1977.
- JAUREGUY, L. M., ETGES, W. J. Assessing patterns of senescence in *Drosophila mojavensis* reared on different host cacti. *Evol. Ecol. Res.*, v.9, p.91–107, 2007.
- JAENIKE, J., HOLT, R. D. Genetic variation for habitat preference: evidence and explanations. *Am. Nat.*, v.137, p.567–590, 1991.
- JONES, B.R., BANCROFT, H.R. Distribution and probable physiological role of esterases in reproductive, digestive, and fat-body tissues of the adult cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* boh. *Biochem. Genetics*, v.24, n.5/6, p.499-508, 1986.
- KAPIN, M.A., AHMAD, S. Esterases in larval tissues of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): Optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem.*, v.10, p.331-337, 1980.
- KAROTAM, J., OAKESHOTT, J.G. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity*, v.71, p.41-50, 1993.
- KAROTAM, J., DELVES, A.C., OAKESHOTT, J.G. Conservation and change in structural and 5' flanking sequences of esterase 6 in sibling *Drosophila* species. *Genetics*, v.88, p.11-28, 1993.
- KORT, C.A.D., GRANGER, N.A. Regulation of the juvenile hormone titer. *Ann. Rev. Entomol.*, v.26, p.1-28, 1981.

- KING L. M., The Role of Gene Conversion in Determining Sequence Variation and Divergence in the *Est-5* Gene Family in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* January 1, v. 148 no. 1 305-316, 1998.
- KIRCHER, H. W. Chemical composition of cacti and its relationship to Sonoran desert *Drosophila*. In: *Ecological genetics and evolution: the cactus-yeast-Drosophila model system* (J. S. F. Barker e W. T. Starmer, eds.), p. 143-158., 1982.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, p. 680-685, 1970.
- LENINGHER, A. L. *Princípios de Bioquímica*. Savier, 3ªed, São Paulo, 2007.
- MATEUS, R. P.; CABRAL, H.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O; CERON, C. R. Molecular weight estimation of esterase isoenzymes in closely related *Drosophila* species (Diptera: Drosophilidae) in non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.52, n. 5: pp.1083-1089, 2009.
- MATEUS, R. P. MACHADO L. P. B., CERON C. R. Gene Duplication and Subsequent Differentiation of Esterases in Cactophilic *Drosophila* Species. *Chapter Number Gene Duplication / Book 2*, 2011
- MATZKIN, L. M. Population genetics and geographic variation of alcohol dehydrogenase (Adh) paralogs and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6pd) in *Drosophila mojavensis*. *Mol. Biol. Evol.*, v.21, p.276–285, 2004.
- MATZKIN, L. M. Activity variation in alcohol dehydrogenase paralogs is associated with adaptation to cactus host use in cactophilic *Drosophila*. *Mol. Ecol.*, v.14, p.2223–2231, 2005.
- MATZKIN, L. M., EANES, W. F. Sequence variation of alcohol dehydrogenase (Adh) paralogs in cactophilic *Drosophila*. *Genetics*, v.163, p.181–194, 2003.
- MATZKIN, L. M., WATTS, H. D., BITLER, B. G., MACHADO, C. A., MARKOW, T. A. Functional genomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. *Mol. Ecol.*, v. 15, p.4635-4643, 2006.
- 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.

- MARKOW T. A., O' GRADY P. M. Evolutionary genetics of reproductive behavior in *Drosophila*: connecting the dots. *Annual Review of Genetics* v. 39: 263-291, 2005.
- MCBRIDE, C. S. Rapid evolution of smell and taste receptor genes during host specialization in *Drosophila sechellia*. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, v.12, p.4996–5001, 2007.
- MERHEB-DINI, C., CABRAL, H. LEITE S. R., ZANPHORLIN L. M., OKAMOTO, B. N., BONILLA G. O. R., ARANTES, E. C., GOMES E., SILVA R. Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the *Thermophilic Fungus Thermoascus aurantiacus*, *J. Agric. Food Chem.* XXXX, 2009.
- MITTER, C., FUTUYMA, D. J. An evolutionary-genetic view of host-plant utilization by insects. *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems* (R. F. Denno e M. S. McClure, eds.), p. 427–459., 1983.
- MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J.M., FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.91, p.5922-5926, 1994.
- MYERS, M.; RICHMOND, R. C. and OAKESHOTT, J. G. On the origins of esterases. *Mol. Biol. Evol.*,5, 113-119, 1988.
- OAKESHOTT, J. G.; HEALY, M. J. and GAME, A. Y. Regulatory evolution of  $\beta$ -carboxyl esterases in *Drosophila*. *Ecological and evolutionary genetics of Drosophila*, ed. J. F. S. Barker, T. W. Starmer and R. J. MacIntyre., pp. 359–387, 1990.
- OAKESHOTT, J. G.; VAN PAPENRECHT, E. A.; BOYCE, T. M.; HEALY, M. J. and RUSSEL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetics*, v.90, 239- 268, 1993.
- PADILHA M. H. P., Fisiologia molecular digestiva de *Musca domestica* (Diptera). Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2009.
- PEN J.; BOLKS G. J.; HOEKSEMA-DU PUI; BEINTEMA J.J. Serine esterases: structural conservation during animal evolution and a variability in enzymic properties in the genus *Drosophila* . *Genetics*, v. 81, p. 125-131, 1990.

- PEN J.; SCHIPPER, A.; HERMAN A. H. R.; BEINTEMA J.J. Differences in specificity and catalytic efficiency between allozymes of esterase-4 from *Drosophila mojavensis* (b). *Mol. Biol. Evol.*, v. 3(4), p. 366-373, 1986.
- PEN J. BEEUMEN J. V.; BEINTEMA J.J. Structural comparison of two esterases from *Drosophila mojavensis* isolated by immunoaffinity chromatography (a). *Biochemical.* , v. 278 p. 691-699, 1986.
- PEN J.; HERMAN A. H. R.; BEINTEMA J.J. Purification and properties of esterase -4 from *Drosophila mojavensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 789 p. 203-209, 1984.
- PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R., SENE, F. M. Notes on breeding and feeding sites of some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Cien. Cult.*, v.35, p.1313-1319, 1983.
- POWELL. J. R. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* model. *Oxford Univ. Press.*, 562p, 1997.
- RAUSHENBAKH, I.YU, LUKASHINA, N.S., KHLEBODAROVA, T.M., KOROCHKIN, L.I. The role of juvenile hormone esterase in Diptera metamorphosis. *Ontogenez*, v.22, n.3, p.274-281, 1991.
- RAYMOND, M., POULIN, E., BOIROUX, V., DUPONT, E., PASTEUR, N. Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Culex pipiens*. *Heredity*, v.70, p.301-307, 1993.
- 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.
- ROBIN, C., BARDSLEY, L.M.J., COPPIN, C., & OAKESHOTT, J.G. Birth and death of genes and functions in the  $\beta$ -esterase cluster of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, v. 69, pp. 10-21, 2009.
- ROBIN, G. C., RUSSEL R. J., CUTLER D. J., OAKESHOTT J.G. The Evolution of an  $\alpha$ -Esterase Pseudogene Inactivated in the *Drosophila melanogaster* Lineage. *Mol. Biol. Evol.* v.17(4):563–575, 2000.
- RUIZ, A.; W. B. HEED; M. WASSERMAN. Evolution de of mojavensis Cluster of cactophilic *Drosophila* with descriptions of two new species. *Journal of Heredity*, v.81 p. 30-42, 1990.
- SCOTT, D. Inhibition of female *Drosophila melanogaster* remating by a seminal fluid protein (esterase 6). *In: Evolution*, v.40, p.1084-1091, 1986.

- SMADJA, C., BUTLIN, R. K. On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity*, on line, <http://dx.doi.org/10.1038/hdy>, 2008.
- SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. *CREIGTON, T. E.* Protein structure a practical approach. Oxford University, cap. 1, p. 1-19, 1989.
- SEMIONATO, S. Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da UTE-UFES. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Centro tecnológico, 2006.
- SILVA, R. R. Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida por *Aspergillus fumigatus Fresenius*. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp - São José do Rio Preto, 2011.
- SOTO, I. M., MANFRIN, M. H., SENE, F. M., HASSON, E. Viability and developmental time in cactophilic *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae) are dependent on the cactus host. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v.100, p.490-496, 2007a.
- SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; FANARA, J. J.; HASSON, E. R.. Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila sibling* species and their hybrids. *BMC Evol. Biol.*, v.7, p.77-87, 2007b.
- SOTO, E. M.; SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; FANARA, J. J.; HASSON, E. Host-related life history traits in interspecific hybrids of cactophilic *Drosophila*. *Entomol. Exp. Appl.*, v.126, p.18-27, 2008a.
- SOTO, I. M., MANFRIN, M. H., HASSON, E. Host-dependent phenotypic plasticity of aedeagus morphology in a pair of cactophilic sibling *Drosophila* species of the repleta group (Diptera, Drosophilidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v.46, p.368-373, 2008b.
- SOTO, I. M., CARREIRA, V. P., SOTO, E. M., HASSON, E. Wing morphology and fluctuating asymmetry depend on the host plant in cactophilic *Drosophila*. *J. Evol. Biol.*, v. 21, p.598-609, 2008c.

- SOTO, I. M., HASSON, E., MANFRIN, M. H. Wing morphology is related to host plants in cactophilic *Drosophila gouveai* and *D. antonietae* (Diptera, Drosophilidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, v. 95, p.655-665, 2008d.
- SREERAMA, L., VEERABHADRAPPA, P.S. Purification and properties of carboxylesterases from the mid-gut of the termite *Odontotermis worni*. *Insect Biochem.*, v.21, n.8, p.833-844, 1991.
- THOMAZINE, V. B. Adaptabilidade diferencial das variantes moleculares “slow” e “fast” da esterase-5 de *Drosophila mulleri*, Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociencias, Letras e Ciências Exatas; São José do Rio Preto, 2007.
- THROCKMORTON, L. H. Pathways of evolution in the genus *Drosophila* and the founding of the repleta group. In: Ecological genetics and evolution: the cactus-yeast-*Drosophila* model system (J. S. F. Barker e W. T. Starmer, eds.), p. 33-47. *Academic Press*, Sydney, Australia, 1982.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M., *Drosophila seriema* n. sp.: New Member of the *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae) Superspecies Taxon. *Annals of the Entomological Society of America*, v.88, n.2, p.139-142, 1995.
- VIA, S. Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. *Annu. Rev. Entomol.*, v.35, p.421-446, 1990.
- VOGT, R.G., RIDDIFORD, L.M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, v.293, p.161-163, 1981.
- ZERA A.J., HOLTMEIER, C.L. In vivo and in vitro degradation of juvenile hormone-III in presumptive long-winged and short-winged *Gryllus rubens*. *J. Insect Physiol.*, v.38, n.1, p.61-74, 1992.
- ZERA A. J.; SANGER T.; HANES J.; HARSHMAN L. Purification and Characterization of Hemolymph Juvenile Hormone Esterase from the Cricket, *Gryllus assimilis*. *Papers in the Biological Sciences*, 2002.
- ZHANG, L., GONG, X., WANG, C.,JI, Y. The Diversity of Esterase Function and Encoding Genes. *Journal of Shenyang Agricultural University*, v.5, p.23-42, 2010.
- ZHOU G. W., GUO J., HUANG W.,FLETTERICK J., SCANLAN T. S. Crystal structure of a catalytic antibody with a serino protease active site. Research article, *Science*, v. 265, 1994.

- ZOUROS E. and DELDEN W.V. Substrate-preference polymorphism at an esterase locus of *Drosophila mojavensis*. *Genetics*, v. 100 p. 307-314, 1981.
- ZOUROS E.; DELDEN W.V.; ODENSE R.; DIJK H. V. An esterase duplication in *Drosophila*: Differences in expression of duplicate loci within and among related species. *Biochemical Genetics*, v. 20 p. 9-10, 1982.
- WAGNER, R.P., SELANDER, R.K. Isozymes in insects and their significance. *Annual Review of Entomology*, v.19, p.117-138, 1974.
- WALKER, C.H., MACKNESS, M.I. Esterases: problems of identification and classification. *Biochem. Pharmacol.*, v.32, p.3265-3269, 1983.
- WASSERMAN, M. Cytological evolution in the *Drosophila repleta* species group. J.S.F. BARKER and W.T. STARNER, *Ecological genetics and evolution: The cactus - Yeast - Drosophila - Model System*. Academic Press., p.49-64, 1982a.
- WASSERMAN, M. Evolution in the repleta group. In: The genetics and biology of *Drosophila* (M. Ashburner, H. L. Carson e J. N. Thompson, Jr., eds.). *Academic* v. 3b, p.61-139., 1982b.
- 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.