

GENES *elov1* EM INSETOS E O PAPEL DE *elov12* NO OVO DE  
*Tribolium castaneum* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

**ULLI BARROS OLIVEIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
SETEMBRO DE

GENES *elov1* EM INSETOS E O PAPEL DE *elov2* NO OVO DE *Tribolium  
castaneum* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

**ULLI BARROS OLIVEIRA**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do título de Doutora  
em Biociências e Biotecnologia.”

Orientador: Dr. Gustavo Lazzaro Rezende

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
SETEMBRO DE 2023

GENES *elov1* EM INSETOS E O PAPEL DE *elov12* NO OVO DE *Tribolium castaneum* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

ULLI BARROS OLIVEIRA

"Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia."

Aprovado em: 06/09/2023

Comissão Examinadora:



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Antônia Elenir Amâncio Oliveira – UENF/CBB

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. David Majerowicz – UFRJ/Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca – UFRJ/Macaé

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende – UENF/CBB

(Orientador)



Governo do Estado do Rio de Janeiro  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
Diretoria do Centro de Biociências e Biotecnologia

## DECLARAÇÃO

A **versão final** da tese de Doutorado intitulada "Genes *elov1* em insetos e o papel de *elov2* no ovo de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)", defendida pela aluna Ulli Barros Oliveira (Matrícula 201912220012) do Programa de Biociências e Biotecnologia da UENF no dia 06 de setembro de 2023, foi **aprovada** pelos membros da banca: Gustavo Lazzaro Rezende (Presidente e membro interno), Rodrigo Nunes da Fonseca (membro externo) e David Majerowicz (membro externo), impossibilitados de assinar presencialmente o documento.

Campos dos Goytacazes, 29 novembro de 2023

Gustavo Lazzaro Rezende  
Professor Associado, LQFPP, CBB, UENF  
ID. Funcional 4391413-6



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Lazzaro Rezende, Professor**, em 29/11/2023, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento nos art. 28º e 29º do [Decreto nº 48.209, de 19 de setembro de 2022](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.rj.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=6](http://sei.rj.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=6), informando o código verificador **64199036** e o código CRC **032F920B**.

Referência: Processo nº SEI-260009/004459/2023

SEI nº 64199036

Avenida Alberto Lamego, 2000, - Bairro Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes/RJ, CEP 28013-602  
Telefone: - www.uenf.br

**Dedico este trabalho à minha querida tia Rosane (*in memoriam*), que nos deixou há pouco tempo, mas jamais será esquecida.**

**“Nunca desista da esperança, não importa o quão ruim tudo pareça.”**

**Star Wars: The Clone Wars**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) pelo apoio logístico para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende pela orientação, confiança, paciência, por me ensinar pessoalmente as técnicas de biologia molecular, pela ajuda nos experimentos, por me fazer crescer como pesquisadora me tornando uma pessoa mais crítica e pela grande oportunidade para a realização deste trabalho.

À Dra. Helena Carolina Martins Vargas que possibilitou a existência deste trabalho iniciando os estudos com a família dos genes *e/ovl*, pela concessão de materiais de biologia molecular, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos colaboradores Dr. Francisnei Pedrosa pelo auxílio com as análises de bioinformática e a Prof. Dra. Ana Eliza Zeirack pela ajuda com as análises realizadas no microscópio Confocal.

À Dra. Josiana Gomes pela revisão da tese, por toda ajuda nos experimentos, pela concessão de materiais de biologia molecular, pelos momentos de desabafo e descontração e por me fortalecer nos momentos difíceis.

À minha colega do grupo de pesquisa Larissa Manhães pelos ensinamentos e palavras de incentivo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo financiamento do projeto ao orientador.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas contribuições.

Ao meu namorado Lucas Leal por, literalmente, fazer com que eu conseguisse realizar o doutorado. Sem toda sua ajuda e apoio eu não teria conseguido.

À minha família por acreditar que seria capaz de chegar até aqui.

Aos meus amigos de longa data Vitor Cyrino, Thalyta Nogueira e Cassio Machado pela amizade verdadeira e consolo durante os momentos difíceis.

Agradeço a Deus, pois minha fé me manteve firme e me fez acreditar que seria capaz de realizar este trabalho.



## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xx
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>25</b>
1.1. O besouro <i>Tribolium castaneum</i> .....	26
1.2. Órgãos reprodutores do <i>Tribolium castaneum</i> .....	28
1.3. A casca do ovo de <i>Tribolium castaneum</i> .....	30
1.4. O desenvolvimento embrionário de <i>Tribolium castaneum</i> .....	32
1.5. Genes <i>elovl</i> em <i>Tribolium castaneum</i> .....	33
<b>2. CAPÍTULO I - Genes of very long chain fatty acids elongases (<i>elovl</i>) in insects: a Review.....</b>	<b>37</b>
2.1. INTRODUCTION.....	39
2.2. The fatty acid elongation system of animals.....	41
2.3. Fatty acid fate after being elongated.....	43
2.4. Characteristics of Elongase proteins and <i>elovl</i> genes.....	44
2.5. The function of the <i>elovl</i> genes in yeast and mammals.....	46
2.6. Functions of <i>elovl</i> genes in insects.....	47
2.6.1. Reproduction.....	48
2.6.2. Waterproofing.....	50
2.6.3. Diapause.....	52
2.6.4. Other functions.....	53
2.7. FINAL CONSIDERATIONS.....	57
<b>3. CAPÍTULO II - Diversidade e evolução das elongases de insetos: uma perspectiva dentro de Opisthokonta.....</b>	<b>59</b>
3.1. INTRODUÇÃO.....	60
3.2. OBJETIVOS GERAIS.....	64
3.2.1. Objetivos específicos.....	65
3.3. METODOLOGIA.....	65
3.3.1. Seleção das espécies para a construção da árvore filogenética.....	65
3.3.2. Obtenção das sequências de elongases.....	66
3.3.3. Análise das sequências das elongases das espécies selecionadas.....	66
3.3.4. Construção da árvore filogenética.....	67
3.3.5. Análise do número de domínios transmembranar das elongases.....	67
3.4. RESULTADOS.....	67
3.4.1. Distribuição evolutiva das espécies utilizadas para a construção da filogenia das elongases.....	67
3.4.2. Filogenia das elongases.....	68

3.4.3. Distribuição das elongases de insetos e outros artrópodes na árvore filogenética.....	71
3.4.4. Número de domínios transmembranar.....	75
3.5. DISCUSSÃO.....	75
3.6. CONCLUSÕES.....	78
<b>4. CAPÍTULO III - O gene <i>Tc-elovl2</i> é essencial para a eclosão da larva do besouro <i>Tribolium castaneum</i> (Coleoptera: Tenebrionidae).....</b>	<b>79</b>
4.1. INTRODUÇÃO.....	80
4.2. OBJETIVO GERAL.....	82
4.2.1. Objetivos específicos.....	82
4.3. METODOLOGIA.....	82
4.3.1. Análise da proteína predita para <i>Tc-elovl2</i> .....	82
4.3.2. Manutenção da criação de <i>Tribolium castaneum</i> .....	82
4.3.3. Obtenção dos ovos de <i>Tribolium castaneum</i> .....	83
4.3.4. Lavagem dos ovos de <i>Tribolium castaneum</i> .....	83
4.3.5. Expressão de <i>Tc-elovl2</i> via RT-PCR.....	83
4.3.6. Silenciamento gênico via pRNAi.....	84
4.3.7. Avaliação da taxa de eclosão dos ovos e do tempo de duração do silenciamento de <i>Tc-elovl2</i> .....	85
4.3.8. Preparação de cutícula para avaliação da morfologia dos embriões.....	85
4.3.9. Avaliação do processo de eclosão das larvas.....	85
4.3.10. Avaliação da taxa de eclosão dos ovos <i>Tc-elovl2<sup>RNAi</sup></i> desenvolvidos em 75 e 99,9% de umidades relativa.....	87
4.3.11. Fixação dos ovos.....	87
4.3.12. Hibridização <i>in situ</i> .....	88
4.3.13. Análise da pleuropódia.....	90
4.3.14. Análise estatística.....	91
4.4. RESULTADOS.....	91
4.4.1. A proteína predita para <i>Tc-elovl2</i> é uma elongase canônica.....	91
4.4.2. expressão de <i>Tc-elovl2</i> em <i>Tribolium castaneum</i> ocorre tanto em fêmeas adultas quanto em ovos postos.....	93
4.4.3. Tempo de duração do efeito do silenciamento de <i>Tc-elovl2</i> nos ovos.....	94
4.4.4. O silenciamento de <i>Tc-elovl2</i> não afeta a morfologia das larvas ao final da embriogênese.....	95
4.4.5. O silenciamento de <i>Tc-elovl2</i> impede as larvas de completarem o processo de eclosão.....	96
4.4.6. A taxa de eclosão de ovos <i>Tc-elovl2<sup>RNAi</sup></i> é similar nas umidades relativas de 75 e 99,9%.....	100
4.4.7. O desenvolvimento pós-embriônico não é afetado pelo silenciamento de <i>Tc-elovl2</i> .....	101

4.4.8.	O gene <i>Tc-elovl2</i> é expresso na serosa e na pleuropódia em ovos de <i>Tribolium castaneum</i> .....	102
4.4.9.	Comparação da pleuropódia de embriões controle e <i>Tc-elovl2<sup>RNAi</sup></i> .....	107
4.5.	DISCUSSÃO.....	108
4.5.1.	A expressão de <i>Tc-elovl2</i> em <i>Tribolium castaneum</i> .....	108
4.5.2.	A duração e efeito do silenciamento em ovos de <i>Tribolium castaneum</i> nas cepas GA-1 e nGFP.....	108
4.5.3.	O efeito do silenciamento de <i>Tc-elovl2</i> via pRNAi na taxa de eclosão dos ovos e morfologia dos embriões de <i>Tribolium castaneum</i> .....	110
4.5.4.	O efeito do silenciamento de <i>Tc-elovl2</i> no processo de eclosão das larvas de <i>Tribolium castaneum</i> .....	111
4.5.5.	<i>Tc-elovl2</i> é expresso nas células da serosa e na pleuropódia.....	113
4.5.6.	A pleuropódia de embriões silenciados para <i>Tc-elovl2</i> .....	117
4.6.	CONCLUSÕES.....	117
5.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	118
	<b>ANEXO I</b> .....	132
	<b>ANEXO II</b> .....	135

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Fases do ciclo de vida do besouro *Tribolium castaneum* a 32 °C.** Representação esquemática dos estágios de ovo com o seu desenvolvimento embrionário, dois estágios larvais dos nove que podem ocorrer, pupa e adulto. Os estágios imaturos de ovo, larva, e pupa duram, respectivamente, três, 15 e cinco dias. Os esquemas não estão em escala. Fonte: adaptado de Klingler e Bucher, 2022.....27

**Figura 2. Adultos e ovos de *Tribolium castaneum*. (A) Fase adulta. (B) Ovos com grãos de farinha de trigo aderidos a sua superfície (superior) e ovos lavados com água sanitária para a remoção da farinha (inferior).** Fonte: imagens da autora.....28

**Figura 3. Anatomia do sistema reprodutor feminino. (A) Esquema generalizado do sistema reprodutor feminino dos insetos.** Fonte: Gullan e Casnston, 2021. **(B) Sistema reprodutor feminino do *Tribolium castaneum*.** Fonte: adaptado de Li *et al.*, 2021.....29

**Figura 4. Esquema geral dos componentes do ovo do *Tribolium castaneum*.** Representação das estruturas de fora para dentro: córion e membrana vitelina (ambas de origem materna) e cutícula serosa (que consiste nas camadas de origem pós-zigótica). Abaixo estão os dois tecidos extraembrionários: serosa e âmnio. Note que o âmnio cobre apenas o lado ventral do embrião, formando uma cavidade amniótica que serve de proteção (Dorn, 1976). Internamente a todas essas estruturas protetoras, encontra-se o embrião e o vitelo. Fonte: adaptado de Jacobs *et al.*, 2015.....31

**Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão da cutícula serosa e da serosa do ovo de *Tribolium castaneum*.** De baixo para cima é mostrado uma célula da serosa e as duas camadas que constituem a cutícula serosa: a endocutícula mais interna e a epicutícula mais externa. A membrana vitelina e o córion, situados acima da epicutícula da serosa, foram removidos. Fonte: adaptado de Rezende *et al.*, 2016.....32

**Figura 6. Etapas do desenvolvimento embrionário do *Tribolium castaneum*. (A) Estágio do blastoderma sincicial. (B) Etapa do blastoderma celular indiferenciado. (C) Diferenciação do blastoderma nas células da serosa com núcleos maiores e células da banda germinal (embrião) e do âmnio com núcleos menores. (D) Células da serosa envolvendo a banda germinal e o âmnio, que se encontra na região ventral. De E a H, as células da serosa foram removidas. (E) Início da extensão da banda germinal. (F) Extensão da banda germinal com seguimentos, apêndices e cabeça mais definidos. (G) Início da retração da banda germinal. (H) Banda germinal retraída e início do fechamento dorsal.** Imagens obtidas através de microscopia de fluorescência. Fonte: adaptado de Schroder *et al.*, 2008.....33

**Figura 7. Taxas de eclosão dos ovos silenciados para os genes *Tc-elov11* a *Tc-elov14*, *Tc-elov17* e *Tc-verm* via pRNAi.** Fêmeas adultas de *Tribolium*

*castaneum* foram injetadas com dsRNA e após 24 horas de postura seus ovos foram coletados e mantidos em estufa à 5% e 75% de umidade relativa até a avaliação da taxa de eclosão. *n.s.*: diferença não significativa; asterisco indica  $P < 0,0001$ , ambos de acordo com *Two-way* ANOVA. Fonte: retirado de Vargas, 2019.....34

**Figura 8. Aspecto de embriões controle e após silenciamento de *Tc-elov2* em estágios iniciais.** Embriões foram fixados e seus núcleos foram visualizados por microscopia de fluorescência após marcação com DAPI nos estágios de blastoderma celular diferenciado (**A, B**) e início da extensão da banda germinal (**C, D**). Nos painéis **A** e **B** é possível observar as células da serosa, mais espaçadas e com núcleos maiores, na região antero-dorsal. Nos painéis **C** e **D** é possível observar o embrião já segmentado, com os lóbulos cefálicos bem evidentes na região mais anterior. Painéis **A** e **C**: embriões controle, painéis **B** e **D**: embriões com fenótipo normal após silenciamento de *Tc-elov2* via pRNAi. Fonte: retirado de Vargas, 2019.....35

**Figure 9. Phylogeny of Opisthokonta.** The phylogenetic relationships between selected Ophistokonta species are shown. Phylogeny data and estimated divergence periods were obtained from timetree.org as of January 30, 2023. All species are mentioned in the text. MYA: Millions of years ago....39

**Figure 10. Elongation pathway of very long chain fatty acids.** The four steps of the fatty acid elongation pathway and their respective enzymes are shown in red boxes: the condensation performed by Elongase; the first reduction performed by KAR; dehydration performed by HACD and the second reduction performed by TER. In this example, the initial acyl-CoA has 16 carbons. The other substrates are malonyl-CoA and two NADPH molecules. The yellow background indicates the 16-carbon chain of the initial substrate and the gray background indicates the two additional carbons from malonyl-CoA..42

**Figure 11. Second cycle of the very long chain fatty acid elongation pathway.** The four steps of the second cycle of the fatty acid elongation pathway after the first cycle shown in Figure 11 are summarized here. The color codes are the same as in Figure 11 and the pink background indicates the two carbons originating from malonyl -CoA added in this second cycle. Compounds that can be formed from the synthesized very long chain fatty acids are indicated in the white box.....43

**Figure 12. Alignment of elongases from five selected species.** Alignment was performed with Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) with default parameters on January 30, 2023. Canonical elongase motifs are indicated in red. Transmembrane domains obtained through the TMHMM ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)) on January 30, 2023 are highlighted in yellow. Symbols below the alignment indicate identical (\*), highly conserved (: ) and conserved (.) residues.....45

**Figure 13. Scheme of the transmembrane profile of an elongase enzyme.** The scheme shows the seven transmembrane domains of elongase embedded

in the membrane of the endoplasmic reticulum. The color codes of the substrates and products are described in the legend of Figure 11.....46

**Figura 14. Árvore filogenética das elongases (ELOVL) de mamíferos.** As elongases se agrupam em três clados: um clado ELOVL3/6 , um clado ELOVL2/5/4, que se divide nos subclados ELOVL2/5 e ELOVL4 e por último o clado ELOVL1/7. Fonte: adaptado de Matsumoto *et al.*, 2012.....60

**Figura 15. Esquema representativo de possíveis destinos evolutivos dos genes originados após evento de duplicação gênica.** Cada barra representa um gene. Após sofrer duplicação, os genes parálogos formados que não sofrem mutações se tornam conservados (barra azul). No processo de formação de um pseudogene, este se torna inativo (barra cinza). No processo de neofuncionalização, uma das cópias do gene duplicado desenvolve uma nova função (barra laranja) e no processo de subfuncionalização, cada cópia do gene duplicado perde uma subfunção através de mutações degenerativas (metade cinza da barra), ficando apenas com uma parte da função do gene ancestral (metade azul da barra). Fonte: adaptado de Moharana, 2020.....62

**Figura 16. Logo HMM dos quatro *motifs* conservados nas sequências das elongases.** Estão representados trechos entre os resíduos 96 e 185 do logo HMM contido no PFAM, modelo que contém ao todo 242 resíduos. Cada letra corresponde ao símbolo dos aminoácidos presente na sequência do *motif* elongase produzido a partir de uma semente com 138 sequências. Em uma mesma posição de resíduo a altura de cada símbolo é proporcional à sua frequência de ocorrência. Os números na parte superior indicam a posição do último resíduo de cada caixa cinza. Fonte: adaptado de PFAM (<http://pfam-legacy.xfam.org/family/PF01151>), 2023.....63

**Figura 17. Representação esquemática do local predito para os resíduos de aminoácidos conservados na elongase de *D. discoideum*.** Os resíduos de aminoácidos conservados estão localizados na região das hélices transmembrana próximas ao citosol celular. A caixa grande em cinza claro representa a membrana do Retículo Endoplasmático (RE), os retângulos em cinza médio representam da terceira a sexta hélices transmembrana das sete preditas e os retângulos em cinza escuro, os *motifs* conservados. Os números que acompanham os símbolos dos resíduos indicam a posição de cada resíduo na sequência da elongase. Fonte: adaptado de Hernandez-Buquer e Blacklock, 2013.....64

**Figura 18. Relações e distância evolutiva das espécies estudadas.** Estão presentes as 18 espécies dentro de Ophistokonta que foram utilizadas para a construção da árvore filogenética das elongases. A espécie que serviu como grupo externo, o musgo *Physcomitrium (Physcomitrella) patens* não está presente. A distância evolutiva entre *P. patens* e o grupo monofilético Ophistokonta é de 1,6 bilhões de anos (dado não mostrado). Os períodos, eras e éons são indicados na parte inferior da figura. Dados obtidos em <http://timetree.org/> em agosto de 2023.....68

**Figura 19. Árvore filogenética das elongases de 18 organismos do grupo Ophisthokonta. (A)** Os clados parafiléticos diferenciam-se pelas cores azul e verde dos ramos. **(B)** Divisão da árvore nos clados ELOVL3/6, ELOVL2/5/4 e ELOVL1/7, com base nas elongases de mamíferos. A elongase do grupo externo (musgo *P. patens*) encontra-se no clado ELOVL2/5/4, indicado pela seta vermelha.....70

**Figura 20. Distribuição das elongases no clado ELOVL3/6 da árvore filogenética.** As linhas curvas externas à árvore destacam as elongases de artrópodos. A linha em verde escuro indica a expansão de parálogos dos colêmbolas *Folsomia candida* e *Orchesella cincta*, linha em verde claro indica os insetos e linhas em marrom o restante dos artrópodes (Crustacea, Myriapoda e Chelicerata). As esferas (●) entre os ramos indicam os valores de bootstrap.....73

**Figura 21. Distribuição das elongases nos subclados ELOVL2/5 e ELOVL4 e no clado ELOVL1/7 da árvore filogenética.** As linhas curvas externas à árvore destacam as elongases de artrópodos. A linha em vermelho indica a expansão dos parálogos do Chelicerata *Ixodes scapularis*, linhas em verde claro indicam os insetos e linhas em marrom indicam Crustacea e Myriapoda. As esferas (●) entre os ramos indicam os valores de bootstrap.....74

**Figura 22. Número de elongases em diferentes espécies de organismos.** Planta (*Arabidopsis thaliana*), levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), galo (*Gallus gallus*), cachorro (*Canis lupus familiaris*), camundongo (*Mus musculus*), humano (*Homo sapiens*), pulgão (*Acyrtosiphon pisum*), bicho da seda (*Bombyx mori*), abelha (*Apis mellifera*), borboleta (*Danaus plexippus*), mosquito (*Anopheles gambiae*), **besouro (*Tribolium castaneum*)**, traça (*Plutella xylostella*) e mosca (***Drosophila melanogaster***). As espécies em negrito também foram analisadas no presente trabalho. Fonte: adaptado de Zuo *et al.*, 2018.....76

**Figura 23. Representação esquemática de um ovo de *Rhagophthalmus ohbai* (Coleoptera: Rhagophthalminae) com embrião de 18 dias de embriogênese.** A embriogênese de *R. ohbai* dura cerca de 30-34 dias. **(A)** vista lateral e **(B)** vista ventral. Mx: maxila; Lb: lábio; PPT: perna protorácica; PP: pleuropódia; A10: décimo segmento abdominal; At: antena; ODS: órgão dorsal secundário. Fonte: adaptado de Kobayashi *et al.*, 2002.....81

**Figura 24. Representação esquemática da degradação da endocutícula que compõe a cutícula serosa em ovos de *Melanoplus differentialis* (Orthoptera: Acrididae) pela ação de enzimas secretadas pela pleuropódia.** O esquema mostra as camadas da casca do ovo e a serosa de *M. differentialis* (à esquerda) e o que resta das camadas da casca do ovo após a ação das enzimas secretadas pela pleuropódia (à direita). Ch: córion, yc: epicutícula da cutícula serosa, wc: endocutícula da cutícula serosa, sp: espaço preenchido por líquido, sc: serosa. Fonte: adaptado de Slifer, 1937.....81

**Figura 25. Sistema de aquisição de imagens digitais para registro do processo de eclosão de ovos. (A)** Celular fixado a um adaptador que se

conecta a uma das lentes oculares da lupa para observação imagens dos ovos que foram montados em lâminas e colocadas sobre uma mini peneira de nylon. Ao lado da lupa uma luminária para uma melhor visualização dos ovos e por cima da luminária e da lupa a capa da lupa para proteger o experimento contra a luz externa. **(B)** Ovos controle montados em lâminas e deixados em placa de petri com água e detergente.....87

**Figura 26.** Esquema representativo da montagem dos ovos em lâmina de vidro com dois espaçadores para a visualização no microscópio.....90

**Figura 27. Alinhamento de elongases de fungo, insetos e humano.** Resíduos de aminoácidos essenciais para atividade catalítica das elongase são indicados em vermelho. Os símbolos abaixo do alinhamento indicam resíduos idênticos (\*), altamente conservados (:) e conservados (.). Scer: *Saccharomyces cerevisiae*, Tcas: *Tribolium castaneum*, Dmel: *Drosophila melanogaster*, Hsap: *Homo sapiens*.....92

**Figura 28. Predição de hélices transmembranas para Tc-ELOVL2.** Sete hélices transmembrana para Tc-ELOVL2 são previstas pelo programa DeepTMHMM. Linhas vermelhas preenchidas indicam hélices transmembrana, linhas em rosa e azul indicam as probabilidades das regiões serem voltadas para a parte interna e externa da bicamada lipídica, respectivamente. Linha laranja indica a probabilidade de existência de peptídeo sinal (que no caso não há).....93

**Figura 29. Expressão gênica de Tc-*elovl2* em ovário e carcaça de fêmea de *Tribolium castaneum*.** Amplificações utilizando cDNAs de ovário e carcaça, DNA genômico (gDNA) e *no template control* (NTC) para os genes *Tc-elovl02* e *Tc-Rps6* (gene constitutivo). O tamanho de banda esperado para o cDNA de *Tc-elovl2* e de *Tc-Rps6* é de 463 e 224 pares de bases, respectivamente. Para o DNA genômico o tamanho esperado é de 7.727 pb para *Tc-elovl2* e 410 pb para *Tc-Rps6*. PP: padrão de peso.....93

**Figura 30. Expressão gênica de Tc-*elovl2* ao longo da embriogênese de *Tribolium castaneum*.** Amplificações com cDNAs obtidos a partir de embriões de 0, 2, 6, 10, 12, 14 (painel à esquerda), 24, 28, 48, 56 e 73 (painel à direita) horas da embriogênese ) e *no template control* (NTC) para os genes *Tc-elovl02* e *Tc-Rps6* (gene constitutivo). O tamanho de banda esperado para o cDNA de *Tc-elovl2* e de *Tc-Rps6* é de 463 e 224 pares de base, respectivamente. PP: padrão de peso.....94

**Figura 31. Duração do silenciamento para Tc-*elovl2* na cepa GA-1.** As taxas de eclosão dos ovos controle e ovos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> foram avaliadas nos dias 3, 6, 7, 14, 17, 21 e 24 após a injeção da dupla fita em fêmeas adultas. Cada ponto representa média e desvio padrão de três experimentos independentes com um total de 1713 ovos controle e 1273 ovos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> analisados. Letras distintas (a, b, c, d, e) significam diferenças significativas na taxa de eclosão dos ovos silenciados entre os diferentes dias após a injeção da dupla fita (ANOVA e teste Tukey, P < 0,05). Asterísco (\*) significa diferença



significativa na taxa de eclosão entre ovos controle e silenciados em um mesmo dia (teste t de Student,  $P < 0,05$ ).....95

**Figura 32. Duração do silenciamento para Tc-elovl2 na cepa nGFP.** As taxas de eclosão dos ovos controle e ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* foram avaliadas nos dias 2, 6, 7, 14, 17, 21 e 24 após a injeção da dupla fita em fêmeas adultas. Cada ponto representa média e desvio padrão de três experimentos independentes com um total de 1851 ovos controle e 1152 *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* analisados. Letras distintas (a, b) significam diferenças significativas na taxa de eclosão dos ovos silenciados entre os diferentes dias após a injeção da dupla fita (ANOVA e teste Tukey,  $P < 0,05$ ). Asterísco (\*) significa diferença significativa na taxa de eclosão entre ovos controle e silenciados em um mesmo dia (teste t de Student,  $P < 0,05$ ).....95

**Figura 33. Morfologia das larvas G1-A ao final da embriogênese nas condições controle e Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>.** Microscopia de fluorescência foi realizada com preparações de cutícula, que emitem autofluorescência no canal verde. Dos 232 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* analisados, 217 (94%) eram larvas completamente formadas. T1, T2, T3, respectivamente: três segmentos torácicos, A1: primeiro segmento abdominal, Ur: urugomphi.....96

**Figura 34. Morfologia das larvas nGFP ao final da embriogênese nas condições controle e Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>.** Microscopia de fluorescência foi realizada com preparações de cutícula, que emitem autofluorescência no canal verde. Dos 170 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* analisados, 164 (96%) eram larvas completamente formadas. T1, T2, T3, respectivamente: três segmentos torácicos, A1: primeiro segmento abdominal, Ur: urugomphi. Os outros 4% eram ovos vazios.....96

**Figura 35. Comportamento das larvas durante o processo, ou tentativa, de eclosão.** Condições e cepas estão indicadas à esquerda de cada sequencia. **(A, F, K, P)** larva dentro do ovo preparando-se para eclodir. **(B, G, L, Q)** a larva começa a se movimentar e forçar a casca do ovo com a parte dorsal do corpo. **(C, R)** a casca se rompe e a larva começa a sair do ovo pela cabeça, processo que não é finalizado em **R**. **(D)** o restante do corpo da larva vai saindo do ovo. **(E)** a larva sai completamente de dentro do ovo. **(H, M)** a larva não consegue sair de dentro do ovo e começa a murchar. **(I, N, S)** a larva segue murchando e diminui de tamanho. **(J, O, T)** a larva incapaz de sair de dentro do ovo murcha completamente. Todos os ovos apresentavam idade de 76 horas de embriogênese no início do experimento, com uma imprecisão de  $\pm 4$  horas....98

**Figura 36. Ovo Tc-elovl2<sup>RNAi</sup> da cepa nGFP de Tribolium castaneum após o final da embriogênese.** A imagem mostra uma parte do corpo da larva de *T. castaneum*, com aspecto desidratada fora do ovo que coberta por grãos de farinha de trigo. **(A)** Vista lateral do ovo. **(B)** larva vista de trás.....99

**Figura 37. O silenciamento de Tc-elovl2 aumenta os períodos relacionados com o processo de eclosão.** **(A)** Idade de desenvolvimento embrionário em que as larvas das três situações (controle, silenciadas que eclodiram e silenciadas que não eclodiram) iniciaram o processo de eclosão. **(B)** Tempo total do processo de eclosão (larvas controle e silenciadas que

eclodiram) e tempo total da tentativa de eclosão (para larvas silenciadas que não eclodiram). Os dois pontos vermelhos em **(B)** são larvas controle que não entraram na análise por apresentar um comportamento muito diferente dos. Foram realizados dois experimentos independentes com ovos controle e três com ovos silenciados. Letras (a, b) distintas significam diferenças significativas (teste t de Student  $P < 0,05$ ).....100

**Figura 38. Taxa de eclosão dos ovos mantidos em 75 e 99,9% de UR.** Ovos controle foram mantidos em 75% de UR enquanto os ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* foram mantidos em 75 e 99,9% de UR. Todos os ovos foram mantidos em estufa a 30 °C. Foi realizado um único experimento com o total de 66 ovos controle, 64 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* colocados em ambiente de 75% de UR e 65 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* colocados em ambiente de 99,9% de UR.....101

**Figura 39. Acompanhamento do desenvolvimento pós-embrionário em larvas eclodidas do grupo controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>*.** Os indivíduos foram acompanhados nos dias 5, 10, 15, 20, 25 e 30 após a eclosão e em cada dia foi contabilizado o número total de larvas, pupas e adultos presentes nos potes. Cada ponto indica a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes. No total foram avaliadas 100 larvas controle e 100 *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* .....102

**Figura 40. O gene *Tc-zen1* é expresso apenas na serosa.** A coloração roxa na *in situ* (painel superior) e os pontos com fundo mais escuro no DAPI (painel inferior) indicam a expressão de *Tc-zen1* na região anterior do blastoderma celular indiferenciado que dará origem as células da serosa. No painel de DAPI, cada ponto branco indica um núcleo celular.....103

**Figura 41. O gene *Tc-G7* é inicialmente expresso na serosa e depois nos segmentos do embrião.** A coloração roxa na *in situ* e os pontos com fundo mais escuro no DAPI indicam a expressão de *Tc-G7*. **(A, A')** expressão nas células da serosa durante o estágio de blastoderma celular indiferenciado. **(B, B')** expressão segmentada no embrião no início da extensão da banda germinal. **(C, C')** expressão nos segmentos da banda germinal no meio de sua extensão. Letras iguais indicam o mesmo embrião. **(A, C)** ovos na posição lateral, **(B)** ovo na posição ventral.....104

**Figura 42. O gene *Tc-elovl2* é fracamente expresso na serosa.** A coloração roxa na *in situ* e os pontos com fundo mais escuro no DAPI indicam a expressão de *Tc-elovl2*. **(A, A')** expressão nas células da serosa na região mais anterior durante o estágio de blastoderma celular indiferenciado. **(B, B')** expressão nas células da serosa na região mais anterior durante o estágio de blastoderma celular diferenciado **(C, C')** expressão nas células da serosa que estão se expandindo para envolver o embrião no início da gastrulação. **(D, D')** expressão nas células da serosa apenas na região anterior no estágio em que a serosa já envolveu todo o embrião. **(E, E')** expressão mais forte nas células da serosa no estágio em que a serosa já envolveu todo o embrião. Letras iguais indicam o mesmo embrião. Todos os ovos estão em posição lateral com a região anterior voltada para a esquerda.....105

**Figura 43. A sonda senso para o gene *Tc-elovl2* não apresenta marcação.** Os painéis superiores são *in situ* que indicam que não houve marcação nos diferentes estágios embrionários, indicados pela marcação com DAPI nos painéis inferiores. **(A, A')** estágio de blastoderma celular indiferenciado. **(B, B')** estágio de início da gastrulação. **(C, C')** estágio da gastrulação em que a serosa está envolvendo a banda germinal que está condensada na região ventral do ovo. **(D, D')** extensão da banda germinal, quando a serosa já envolveu completamente o embrião.....105

**Figura 44. Padrão de expressão de *Tc-G7* (controle positivo) e *Tc-elovl2* senso (controle negativo) em embriões tardios de *Tribolium castaneum*.** A coloração roxa na *in situ* e preta no DAPI indicam a expressão dos genes. **(A-B')** expressão de *Tc-G7* na região lateral dos segmentos abdominais e torácicos, nas pernas e na pleuropódia dos embriões. **(C-D')** sem marcação de *Tc-elovl2* nos embriões hibridizados com a sonda senso. Letras iguais indicam o mesmo embrião. **(A, C)** embriões na posição ventral, **(B, D)** embriões na posição lateral.....106

**Figura 45. Padrão de expressão de *Tc-elovl2* antisense em embriões tardios de *Tribolium castaneum*.** A coloração roxa na *in situ* e preta no DAPI indicam a expressão de *Tc-elovl2*. **(A-B')** expressão de *Tc-elovl2* na pleuropódia dos embriões. **(A, A')** embriões na posição ventral. **(B, B')** embriões na posição lateral. As setas apontam para a pleuropódia.....107

**Figura 46. Microscopia de fluorescência convencional e confocal da pleuropódia de embriões de *Tribolium castaneum*.** Ovos da cepa nGFP com idade entre 48-56 horas de embriogênese foram utilizados. **(A-D)** microscopia convencional de fluorescência. **(E-G)** microscopia confocal de fluorescência. **(A, E)** Embriões inteiros. Em **E** o embrião está envolto pelas células da serosa. As setas amarelas indicam algumas células da serosa. **(B-G)** Região da pleuropódia em detalhe. O círculo tracejado envolve a pleuropódia e as setas vermelhas indicam a pleuropódia nos embriões inteiros. T1, T2 e T3: 1º, 2º e 3º segmento torácico, respectivamente. A1: 1º segmento abdominal. P: perna. Foram analisados 73 ovos controle e 67 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* na microscopia convencional e 21 ovos controle e 33 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* na microscopia confocal.....108

**Figura 47. Padrão de expressão de *Tc-zen1* durante a embriogênese inicial de *Tribolium castaneum*.** A coloração roxa na *in situ* e os pontos com fundo mais escuro no DAPI indicam a expressão de *Tc-zen1* nas células da serosa que se expande da região anterior do ovo para a região posterior até envolver o embrião. **(A-C')** expressão nas células da serosa durante estágios de blastoderma celular indiferenciado. **(D e G')** expressão nas células da serosa durante estágios de gastrulação. Letras iguais indicam o mesmo embrião. Ovos na posição lateral com a região dorsal para a esquerda e ventral para baixo. A barra de escala em (A) representa 100 µm. Fonte: adaptado de Gurská (2017).....114

**Figura 48. Microscopia de campo claro convencional de cortes longitudinais da pleuropódia de um embrião de *Rhagophthalmus ohbai***

**em diferentes idades embrionárias. (A-D)** pleuropódia em desenvolvimento em embriões com, respectivamente, 10, 13, 14 e 17 dias de embriogênese. **(A)** a pleuropódia aparece apenas como um apêndice no primeiro segmento abdominal sem diferenciação das células ectodérmicas ao redor. **(B)** a pleuropódia se desenvolve em uma estrutura globulosa com células longas que podem ser diferenciadas das células ectodérmicas. **(C)** a mono camada de células da pleuropódia apresenta uma estrutura semelhante a um disco com superfície plana. **(D)** as células da pleuropódia se tornam maiores e mais largas aumentando o diâmetro do órgão como um todo. **(E)** pleuropódia de um embrião com 18 dias de embriogênese. Neste estágio a pleuropódia muda de forma, a parte mais distal das células se tornam ainda mais alongadas e os núcleos ficam mais próximos a parte proximal. Acredita-se que é nesse estágio que a pleuropódia secreta grânulos com enzimas que degradará a cutícula serosa. **(F)** pleuropódia em degeneração retraindo-se para dentro do corpo de um embrião com 27 dias de embriogênese. TS3: 3º segmento torácico, PP: pleuropódia, GrST: substância granular, TL: perna torácica, Am+Se: âmnio + serosa.....115

**Figura 49. Microscopia eletrônica de transmissão da ultraestrutura da pleuropódia de *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera).** Os cortes mostram: **(A)** as microvilosidades (mv) e os grânulos de secreção (gr) da pleuropódia, **(B)** retículo endoplasmático liso (rel) e **(C)** cutícula embrionária (c) que recobre a pleuropódia em processo de degradação. Fonte: adaptado de Viscuso e Sottile, 2008.....116

## LISTA DE TABELAS

**Table 1.** Number of *elovl* genes in different insect species.....48

**Tabela 2.** Número de elongases das 19 espécies utilizadas para a construção da árvore filogenética separadas no clado ELOVL3/6, subclados ELOVL2/5 e ELOVL4 e clado ELOVL1/7. Em cinza o musco *P. patens* utilizado como grupo externo.....72

**Tabela 3.** Número de domínios transmembranar das elongases das 19 espécies utilizadas para a construção da árvore filogenética. Em cinza o musgo *P. patens* utilizado como grupo externo.....75

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG – Ácido graxos

cDNA – DNA complementar (do inglês *complementary DNA*)

*CHT10* – Gene quitinase 10

DAI – Dias após a injeção

*Dll* – Gene *Distalless*

dsRNA – Dupla fita de RNA

*e.g.* – Por exemplo (do latim *exempli grata*)

ELOVL – Enzima elongase

*elovl* – Gene elongase

FASC – Complexo ácido graxo sintase (do Inglês *fatty acid synthase complex*)

GFP – Proteína verde fluorescente (do inglês *green fluorescent protein*)

*i.e.* – Isto é (do latim *id est*)

MUFAs – Ácidos graxos monoinsaturados (do inglês *Monounsaturated Fatty Acids*)

*Mxp* – Gene *maxillopedia*

PBS – Tampão fosfato-salino (do Inglês *Phosphate-buffered saline*)

PBT – Tampão fosfato-salino com Tween-20 (do Inglês *Phosphate-buffered saline supplemented with Tween 20*)

pRNAi – RNA de interferência parental

PUFAs – Ácidos graxos poli-insaturados (do inglês *Poly Unsaturated Fatty Acids*)

RNAi – RNA de interferência

RT-PCR – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

SFAs – Ácidos graxos saturados (do Inglês *Saturated Fatty Acids*)

TMs – Transmembranar

TMHMM – Transmembrane hidden markov model

UR – Umidade relativa

*verm* – Gene *vermillium*

VLCFA – ácido graxo de cadeia muito longa (do inglês *very long chain fatty acid*)

WBS – Western blocking reagent  
*zen1* – Fator de transcrição *zerknüllt1*

## RESUMO

O besouro *Tribolium castaneum* é uma espécie cosmopolita, com registro de ocorrência em regiões tropicais, sendo uma praga de grãos armazenados. Um aspecto que auxilia a sobrevivência dos ovos deste besouro é a presença de dois tecidos extra-embrionários: âmnio e serosa, que apresentam diversas funções importantes durante a embriogênese. O nosso grupo já mostrou que alguns genes da família *elovl* são expressos na serosa do *T. castaneum* e um deles, *Tc-elovl2*, quando silenciado via pRNAi, acarreta grande mortalidade dos ovos apesar da embriogênese inicial ocorrer normalmente. Os genes *elovl* codificam elongases, enzimas que atuam na via de biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa. Esses ácidos graxos são precursores de compostos hidrofóbicos que desempenham diversos papéis biológicos. Neste contexto, com o intuito de abranger diferentes informações sobre os genes *elovl*, esta tese foi dividida em três capítulos. O primeiro capítulo é uma revisão sobre características gerais das elongase e todas as funções conhecidas dos genes *elovl* em insetos. De acordo com a literatura os genes *elovl* estão presentes em todos os eucariotos, são conservados ao longo da evolução, mas o número de parálogos varia entre organismos. Levedura e humanos possuem, respectivamente, três e sete *elovl*, todos bem descritos. Já os insetos apresentam número de genes *elovl* variando entre 3 e 37 parálogos por espécie e estes atuam em diferentes funções. No segundo capítulo foi avaliada as relações filogenéticas sobre as elongases em insetos comparando com elongases de outros organismos pertencentes ao grupo Ophistokonta. Para isso, foi gerada uma árvore filogenética utilizando o método de Máxima Verossimilhança com sequências de elongases de 18 organismos do grupo Ophistokonta e uma espécie de musgo utilizada como grupo externo. A árvore das elongases apresentou dois grandes grupos parafiléticos. Tendo como referência a filogenia de mamíferos, as elongases se distribuíram em três clados: ELOVL3/6, ELOVL2/5/4 e ELOVL1/7. No clado ELOVL3/6 ocorre uma expansão de elongases em colêmbolos, como por exemplo *Folsomia candida* que possui 30 parálogos e no clado ELOVL1/7 ocorre uma expansão das elongases do carrapato *Ixodes scapularis* com 79 parálogos e das elongases de insetos que variam de 5 a 18. Não ocorre agrupamento específico de elongases com características semelhantes na árvore filogenética, contrariando postulações feitas na literatura. O terceiro capítulo investiga o papel do gene *Tc-elovl2* no ovo de *T. castaneum* através de análises experimentais. O gene *Tc-elovl2* é expresso nas fêmeas adultas e nos ovos postos durante toda a embriogênese. A morfologia de embriões silenciados para *Tc-elovl2* mostrou-se sem alterações significativas, assim como parece ser o desenvolvimento muscular e neuronal, apesar das larvas tentarem, mas não conseguirem sair do ovo. A hibridização *in situ* mostrou que *Tc-elovl2* é fracamente expresso nas células da serosa durante a embriogênese inicial e possui uma expressão exclusiva na pleuropódia na embriogênese tardia. A pleuropódia é formada normalmente após o silenciamento. Possivelmente *Tc-elovl2* participa na função da pleuropódia, órgão glandular transitório, presente no embrião de insetos de muitas ordens, que secreta enzimas necessárias para a eclosão.

**Palavras-chave:** eclosão, elongase, *elovl*, evolução, inseto



## ABSTRACT

The beetle *Tribolium castaneum* is a cosmopolitan species, with records of occurrence in tropical regions, being a pest of stored grains. One aspect that helps the survival of eggs from this beetle is the presence of two extra-embryonic tissues: amnion and serosa, which have several important functions during embryogenesis. Our group has already shown that some genes of the *elovl* family are expressed in the serosa of *T. castaneum* and one of them, *Tc-elovl2*, when silenced via RNAi, causes high egg mortality despite normal initial embryogenesis. The *elovl* genes encode elongases, enzymes that act in the very long-chain fatty acid biosynthesis pathway. These fatty acids are precursors of hydrophobic compounds that play different biological roles. In this context, with the aim of covering different information about the *elovl* genes, this thesis was divided into three chapters. The first chapter is a review of general characteristics of elongases and all known functions of *elovl* genes in insects. According to the literature *elovl* genes are present in all eukaryotes, are conserved throughout evolution, but the number of paralogs varies between organisms. Yeast and humans have three and seven *elovl* respectively, all well described. Insects, on the other hand, have a number of *elovl* genes varying between three and 37 paralogs per species and these act in different functions. In the second chapter it was evaluated the phylogenetic relationships about elongases in insects comparing with elongases of other organisms belonging to the Ophisthokonta group. For this, a phylogenetic tree was generated using the Maximum Likelihood method with elongase sequences from 18 organisms of the Ophisthokonta group and a moss species used as an outgroup. The elongase tree presented two major paraphyletic groups. Based on the phylogeny in mammals, elongases are distributed in three clades: ELOVL3/6, ELOVL2/5/4 and ELOVL1/7. In the clade ELOVL3/6 there is an expansion of elongases in springtails, such as *Folsomia candida* with 30 paralogs and in the clade ELOVL1/7 there is an expansion of elongases of the tick *Ixodes scapularis* with 79 paralogs and of elongases in insects varying between 5 and 18. There is no specific grouping of elongases with similar characteristics in the phylogenetic tree, contrary to assumptions made in the literature. The third chapter investigates the role of the *Tc-elovl2* gene in the *T. castaneum* egg through experimental analyses. The gene *Tc-elovl2* is expressed in adult females and, in laid eggs, throughout embryogenesis. The morphology of embryos silenced for *Tc-elovl2* showed no significant alterations, as well as muscular and neuronal development, despite the fact that the larvae tried but did not manage to leave the egg. *In situ* hybridization showed that *Tc-elovl2* is weakly expressed in serosa cells during early embryogenesis and has an exclusive expression in pleuropodia in late embryogenesis. The pleuropodia is formed normally after gene silencing. Possibly *Tc-elovl2* participates in the function of the pleuropodia, a transitory glandular organ, present in the embryo of insects of many orders, which secretes enzymes necessary for hatching.

**Keyword:** hatching, elongase, *elovl*, evolution, insects

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os insetos (Filo Arthropoda, Superclasse Hexapoda, Classe Insecta) formam o grupo animal predominante, apresentando um sucesso evolutivo sem paralelos. Do número total de 1,5 milhão de espécies animais conhecidas no mundo, 1 milhão são de insetos, ou seja, cerca de 66%. Entre os artrópodes, esse percentual sobe para 83% das espécies descritas. E dentre os insetos, os besouros (ordem Coleoptera) somam cerca de 390 mil espécies descritas. Em outras palavras, de cada 4 espécies de animais, uma é de besouros (Zhang, 2011).

Os insetos possuem ampla diversidade ecológica e distribuição geográfica quando comparado a outros seres vivos. São relevantes para os seres humanos e para os ecossistemas em geral por atuarem como polinizadores, produtores de alimento, fontes de alimento, vetores de doenças, pragas agropecuárias, dispersores de sementes, recicladores de nutrientes e produtores de compostos comercializados por humanos, como cera, seda e corantes. Algumas espécies de insetos são consideradas espécies-chaves, pois realizam funções essenciais, sem as quais muitas formas de vida entrariam em declínio. Espécies de abelhas que atuam como polinizadores de plantas nativas e cultivadas, por exemplo, garantem a restauração de ecossistemas e alimento para a população (Michener, 2000; Grimaldi e Engel, 2005; Gullan e Cranston, 2021).

Muitos fatores contribuíram para o incomparável sucesso evolutivo dos insetos, tais como: seus reduzidos tamanhos corporais; variação dos apêndices locomotores e bucais; holometabolia; desenvolvimento de asas e coevolução com outros grupos, de plantas a humanos (Grimaldi e Engel, 2005). Alguns autores afirmam ainda que características particulares dos ovos dos insetos também foram importantes para a predominância deste grupo tão heterogêneo (Zeh *et al.*, 1989; Jacobs *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 2021). Portanto a grande riqueza de espécies de insetos existentes resulta de um conjunto de características decorrentes de altas taxas de especiação em que muitas dessas características ainda são pouco compreendidas.

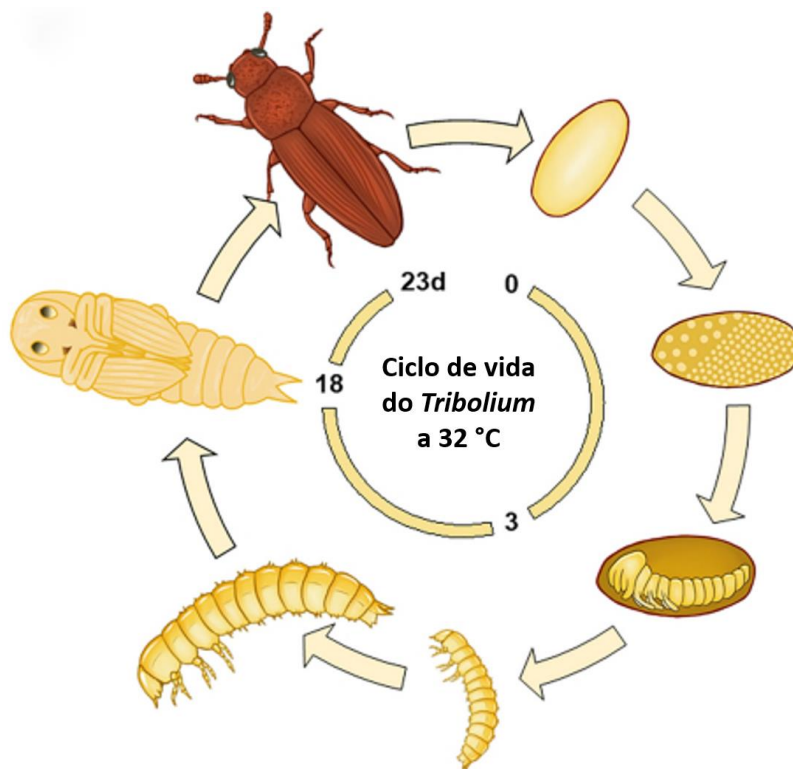
Nesse contexto, o estudo de insetos que possuam ciclo de vida bem caracterizado que sejam de fácil criação e manipulação em laboratório e possua ferramentas moleculares disponíveis é relevante para um maior entendimento de alguns aspectos desse sucesso evolutivo dos insetos. Um organismo que atende a todos os requisitos acima é o besouro *Tribolium castaneum*.

### **1.1. O besouro *Tribolium castaneum***

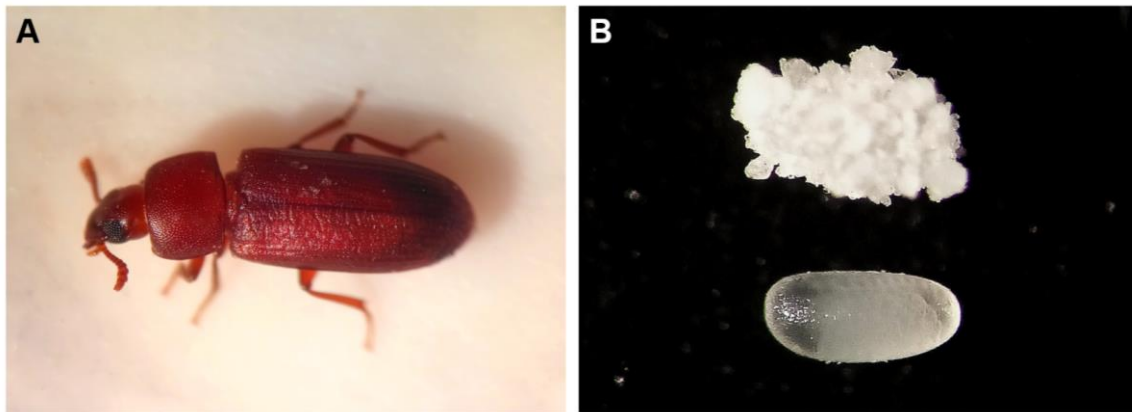
O *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) é uma espécie cosmopolita, com registro de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais. Esse besouro possui grande importância econômica devido a sua capacidade de infestação de grãos armazenados que fazem parte da alimentação humana, como o trigo, milho e arroz. O *T. castaneum* é considerado uma praga secundária, pois não é capaz de danificar os grãos íntegros e sadios e por isso se aproveita dos grãos já danificados por outras pragas, o que o torna um indicador da presença de pragas primárias nos grãos. Pelo fato de não conseguir quebrar os grãos inteiros o *T. castaneum* se alimenta principalmente de farelos e grãos processados como farinhas e rações (Good, 1936; Lorini, 2008). Estudos vêm mostrando que o *T. castaneum* é resistente a diferentes inseticidas químicos, que é o método mais utilizados para o controle de pragas de grãos armazenados (Oliveira, 1997; Guedes *et al.*, 2006; 2008; Farias, 2015; Baena *et al.*, 2019). A resistência a inseticidas e a rápida infestação dos grãos indicam a importância *T. castaneum* como um dos principais insetos-praga que ocasiona grande perda de grãos armazenados.

O ciclo de vida do *T. castaneum* consiste em estágios de ovo, larva, pupa e adulto, com duração dependente da temperatura. A 32 °C, por exemplo, o ciclo completo dura cerca de 23 dias (Figura 1) (Klingler e Bucher, 2022, 2009). A fase adulta do *T. castaneum* mede entre 2,3 e 4,4 mm de comprimento e apresenta cor castanho avermelhada, por esta razão este besouro é conhecido popularmente como besouro castanho ou besouro vermelho da farinha (*red flour beetle*) (Figura 2A). As fêmeas ovipositam nas fendas das paredes dos armazéns, na sacaria e sobre os grãos, podendo

colocar até 20 ovos por dia. Os ovos do *T. castaneum* possuem formato oval, coloração clara e são pegajosos (Figura 2B, inferior), por isso quando colocados sob a farinha, essa se adere à superfície dos ovos (Figura 2B, superior) ou os ovos se aderem à superfície dos grãos dentro dos silos. Após a eclosão, as larvas passam por vários estágios, variando de 5 a 9 estágios, dependendo das condições ambientais em que se encontram. Ao final do último instar larval elas se transformam em pré-pupa, em seguida em pupa e por fim, chegam a fase adulta que possui vida longa, podendo chegar a anos (Lorini, 2008; Bucher, 2009; Walski *et al.*, 2016).



**Figura 1. Fases do ciclo de vida do besouro *Tribolium castaneum* a 32 °C.** Representação esquemática dos estágios de ovo com o seu desenvolvimento embrionário, dois estágios larvais dos nove que podem ocorrer, pupa e adulto. Os estágios imaturos de ovo, larva, e pupa duram, respectivamente, três, 15 e cinco dias. Os esquemas não estão em escala. Fonte: adaptado de Klingler e Bucher, 2022.

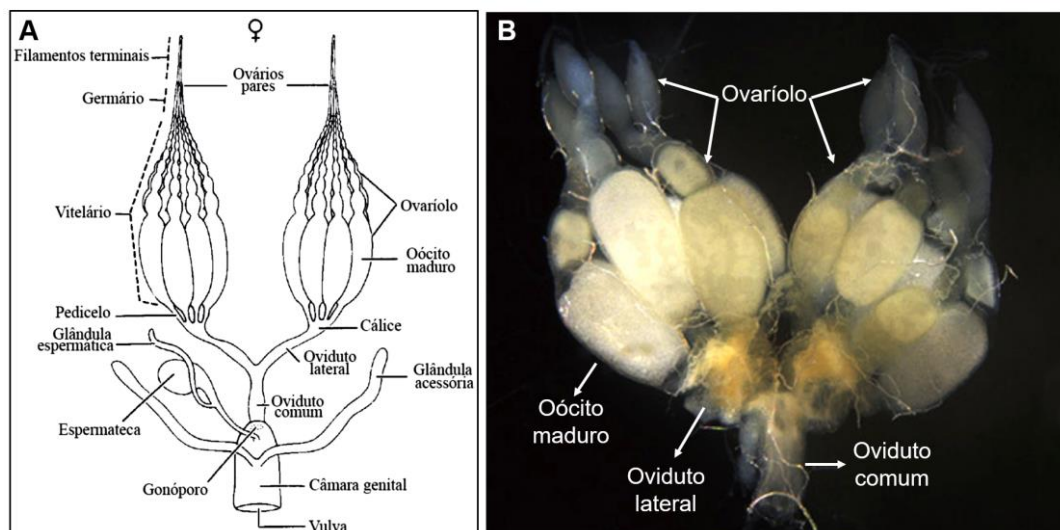


**Figura 2. Adultos e ovos de *Tribolium castaneum*. (A)** Fase adulta. **(B)** Ovos com grãos de farinha de trigo aderidos a sua superfície (superior) e ovos lavados com água sanitária para a remoção da farinha (inferior). Fonte: imagens da autora.

Nas últimas décadas o *T. castaneum* vem sendo utilizado como modelo de estudo em diversas áreas, incluindo a embriologia, genética e biologia do desenvolvimento. Diversas características facilitam o estudo dessa espécie, tais como o seu curto ciclo de vida, a facilidade na manutenção de sua criação e a disponibilidade de ferramentas moleculares como o genoma sequenciado, a existência de mutantes, cepas transgênicas e a técnica de silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) (Sokoloff, 1974; Bucher *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2009; TGSC, 2008). A técnica de RNAi consiste na injeção de duplas fitas de RNA (dsRNA) para um gene alvo no organismo. Esses dsRNA são convertidos em sequências mais curtas capazes de se ligar a região complementar do mRNA alvo com ajuda de um complexo de proteínas conhecido como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), levando assim à degradação do mRNA e conseqüentemente ao silenciamento do gene (Belles, 2009; Terenius, 2011). Além disso, é possível realizar RNAi parental (pRNAi) em *T. castaneum*, que consiste em injetar dsRNA do gene alvo na mãe, onde o processo de silenciamento é passado para o ovo, indo silenciar genes durante a embriogênese, mesmo aqueles que possuem expressão exclusivamente zigótica, isso é, são expressos apenas no ovo e não são expressos pela mãe (van der Zee *et al.*, 2005).

## **1.2. Sistema reprodutor feminino e ovogênese do *Tribolium castaneum***

O sistema reprodutor do *T. castaneum* é constituído de componentes básicos presentes nos demais insetos (Figura 3A) apesar da especificidade de sua anatomia (Figura 3B) que pode variar quando comparada com diferentes espécies. Nas fêmeas, essencialmente esse sistema compreende um par de ovários responsável pela produção e liberação dos oócitos através de uma estrutura chamada de cálice, seguindo para os ovidutos laterais, que por sua vez se unem formando o oviduto comum. A abertura do oviduto comum denominada de gonóporo se estende formando a câmara genital, que possui duas estruturas conectadas: uma única espermateca e as glândulas acessórias. A espermateca consiste de múltiplos túbulos e é local de armazenamento de espermatozoides, que podem vir de diferentes machos (Sinha, 1953) e as glândulas acessórias podem realizar diferentes funções. A câmara genital funciona como uma bolsa copulatória (*bursa copulatrix*), onde os machos depositam os espermatozoides, e termina em uma abertura chamada de vulva (Figura 3A). A produção de oócitos e armazenamento de espermatozoides são as duas principais funções dos órgãos que constituem o sistema reprodutor feminino (Chapman, 2013; Gullan e Cranston, 2021).



**Figura 3. Anatomia do sistema reprodutor feminino. (A)** Esquema generalizado do sistema reprodutor feminino dos insetos. Fonte: Gullan e Casnston, 2021. **(B)** Sistema reprodutor feminino do *Tribolium castaneum*. Fonte: adaptado de Li *et al.*, 2021.

Duas estruturas muito importantes dos ovários são os germários e os vitelários, que também são os locais onde ocorre a ovogênese. A ovogênese inicia-se no germário, que é o local de produção dos oócitos a partir de divisões

das células da linhagem germinativa. Este processo ocorre quando as células germinativas totipotentes se dividem e uma das células filhas formada se desenvolve e passa a se chamar cistócito, que se transforma em ócito primário. Ao deixar o germário e descer pelo ovariolo, o ócito formado é envolto por células pré-foliculares até se tornar um ócito maduro (Chapman, 2013). O vitelário é o local em que ocorre a vitelogênese, processo de acumulação de vitelo (Dhadialla *et al.*, 1992). O vitelo é constituído basicamente de lipídeos e proteínas. Os lipídeos são armazenados principalmente na forma de triglicérides e as proteínas derivam da vitelogenina, uma lipoglicoproteína sintetizada no corpo gorduroso sob o controle do hormônio juvenil. A vitelogenina liberada na hemolinfa entra nos ócitos através de endocitose e por fim, são armazenadas na forma de vitelinas, que constituem, junto com os lipídeos, na principal fonte de nutriente para o embrião em desenvolvimento (Engelmann, 1979; Raikhel e Dhadialla, 1992; Valle, 1993). A ovogênese é finalizada com a coriogênese, que consiste na deposição das camadas da casca do ovo (Wu *et al.*, 2008).

### **1.3. A casca do ovo de *Tribolium castaneum***

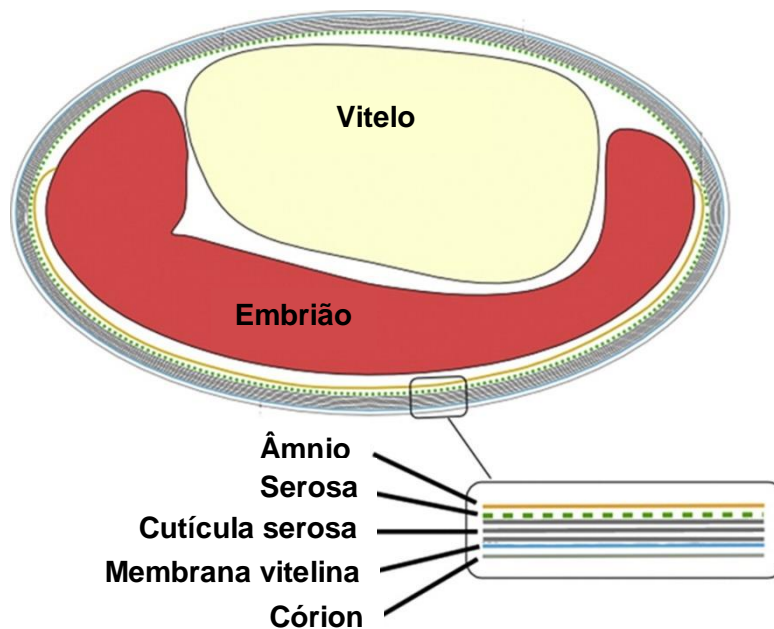
Nos insetos a casca dos ovos possui diversas camadas que podem ter duas origens. As camadas de origem materna são secretadas pelas células epiteliais do folículo ovariano durante o estágio final da ovogênese. Já as camadas de origem pós-zigótica são sintetizadas durante a embriogênese (Rezende *et al.*, 2016). Tanto as camadas de origem materna como as pós-zigóticas são essenciais para a sobrevivência dos ovos dos insetos.

No *T. castaneum* as camadas de origem materna consistem em uma membrana vitelina mais interna e um córion mais externo. Por sua vez, esse córion é constituído de uma camada mais externa que compreende uma cobertura mucosa com aspecto pegajoso, seguido de um exocório e um endocório mais interno (Figura 4) (Gautam *et al.*, 2015). Essas camadas maternas, ao mesmo tempo que protegem os ovos contra predadores, microorganismos patogênicos e uma perda excessiva de água, são responsáveis pelas trocas gasosas entre o interior do ovo e o ambiente externo (Rezende *et al.*, 2016; Woods *et al.*, 2005).



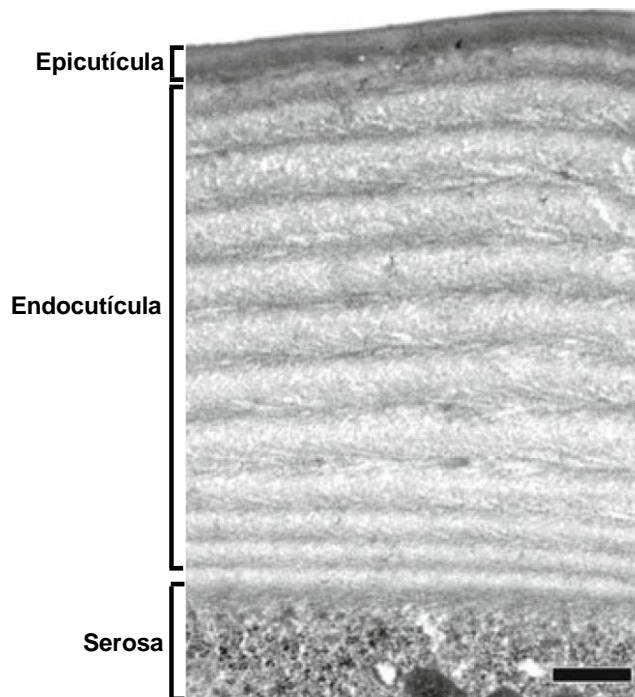
As camadas de origem pós-zigótica são coletivamente denominadas de cutícula serosa, que é formada por uma epicutícula supostamente composta por proteínas e lipídios e uma endocutícula espessa que contém proteínas e quitina (Figura 4 e 5). A cutícula serosa é responsável por aumentar a proteção do embrião contra a perda de água e ao ataque de predadores (Jacobs *et al.*, 2013; Rezende *et al.*, 2016).

A cutícula serosa se origina a partir da serosa, um dos tecidos extraembrionários dos insetos (Figura 5). Durante a embriogênese, a serosa envolve o âmnio (o outro tecido extraembrionário dos insetos), o embrião e o vitelo e atua em diversos processos, como no sistema imune inato, catabolismo do vitelo e transporte de metabólitos para a cavidade amniótica (Zen *et al.*, 1989; Lamer e Dorn, 2001; Woods *et al.*, 2005; Jacobs e van der Zee, 2013).



**Figura 4. Esquema geral dos componentes do ovo do *Tribolium castaneum*.** Representação das estruturas de fora para dentro: córion e membrana vitelina (ambas de origem materna) e cutícula serosa (que consiste nas camadas de origem pós-zigótica). Abaixo estão os dois tecidos extraembrionários: serosa e âmnio. Note que o âmnio cobre apenas o lado ventral do embrião, formando uma cavidade amniótica que serve de proteção (Dorn, 1976). Internamente a todas essas estruturas protetoras, encontra-se o embrião e o vitelo. Fonte: adaptado de Jacobs *et al.*, 2015.



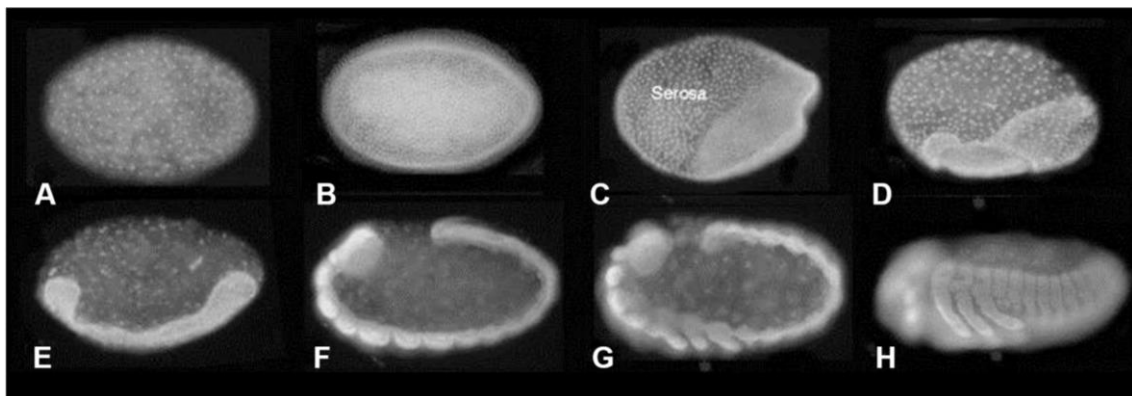


**Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão da cutícula serosa e da serosa do ovo de *Tribolium castaneum*.** De baixo para cima é mostrado uma célula da serosa e as duas camadas que constituem a cutícula serosa: a endocutícula mais interna e a epicutícula mais externa. A membrana vitelina e o córion, situados acima da epicutícula da serosa, foram removidos. Fonte: adaptado de Rezende *et al.*, 2016.

#### **1.4. O desenvolvimento embrionário de *Tribolium castaneum***

O começo do desenvolvimento embrionário é marcado pela fecundação do oócito maduro pelo espermatozoide. Essa fecundação ocorre na câmara genital, em que o oócito que vem do oviduto comum se encontra com o espermatozoide vindo da espermateca. Em seguida, o núcleo do zigoto formado sofre divisões mitóticas e dá origem aos energídeos, que são constituídos pelos vários núcleos gerados após as divisões e o citoplasma que os circundam. Os energídeos ao migrarem para a periferia do ovo formam o blastoderma sincicial. Após alguns ciclos de divisões mitóticas ocorre a transformação de blastoderma sincicial (Figura 6A) para blastoderma celular (Figura 6B), que possui uma única camada de células organizadas e idênticas (Chapman, 2013). Posteriormente ocorre a diferenciação do blastoderma celular nos dois tecidos extraembrionários (serosa e âmnio) e no embrião, também chamado neste momento de banda germinal (Handel *et al.*, 2000). Logo em seguida acontece a gastrulação e durante este processo a serosa apresenta células visivelmente maiores com núcleos poliplóides, enquanto o embrião e o âmnio apresentam células menores, diplóides (Brown *et al.*, 1994) (Figura 6C).

Depois da gastrulação, as células da serosa envolvem o âmnio e toda a banda germinal e a partir de agora a serosa secreta a cutícula serosa (Figura 6D). O embrião propriamente dito se alonga em um processo chamado de extensão da banda germinal (Figura 6E) e a cutícula serosa (Brown *et al.*, 1994) vai se tornando cada vez mais espessa com o decorrer da embriogênese. A banda germinal se diferencia e os seus segmentos, os apêndices e a cabeça se tornam cada vez mais definidos (Heming, 2003) (Figura 6F e G) e em seguida ela se retrai. Posteriormente, já perto do fim do desenvolvimento embrionário ocorre a redução progressiva da serosa (Figura 6H) e por fim, as partes dorsais do embrião se fundem em um processo denominado fechamento dorsal. Com o término do fechamento dorsal a larva se apresenta completamente formada e está pronta para eclodir para fora do ovo (Panfilio *et al.*, 2013).

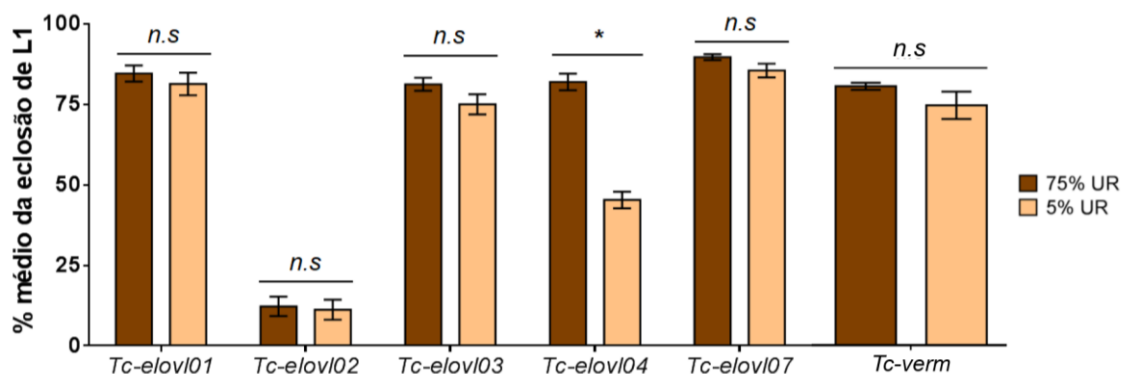


**Figura 6. Etapas do desenvolvimento embrionário do *Tribolium castaneum*.** (A) Estágio do blastoderma sincicial. (B) Etapa do blastoderma celular indiferenciado. (C) Diferenciação do blastoderma nas células da serosa com núcleos maiores e células da banda germinal (embrião) e do âmnio com núcleos menores. (D) Células da serosa envolvendo a banda germinal e o âmnio, que se encontra na região ventral. De E a H, as células da serosa foram removidas. (E) Início da extensão da banda germinal. (F) Extensão da banda germinal com segmentos, apêndices e cabeça mais definidos. (G) Início da retração da banda germinal. (H) Banda germinal retraída e início do fechamento dorsal. Imagens obtidas através de microscopia de fluorescência. Fonte: adaptado de Schroder *et al.*, 2008.

### 1.5. Genes *elovl* em *Tribolium castaneum*

Os genes *elovl* codificam elongases, enzimas que atuam na via de biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa. Esses ácidos graxos por sua vez servem de substrato para uma variedade de compostos hidrofóbicos que podem atuar de diferentes formas biológicas (Cook e McMaster, 2002; Leonard *et al.*, 2004). Os genes *elovl* e suas funções serão descritos de forma detalhada no Capítulo 1 desta tese.

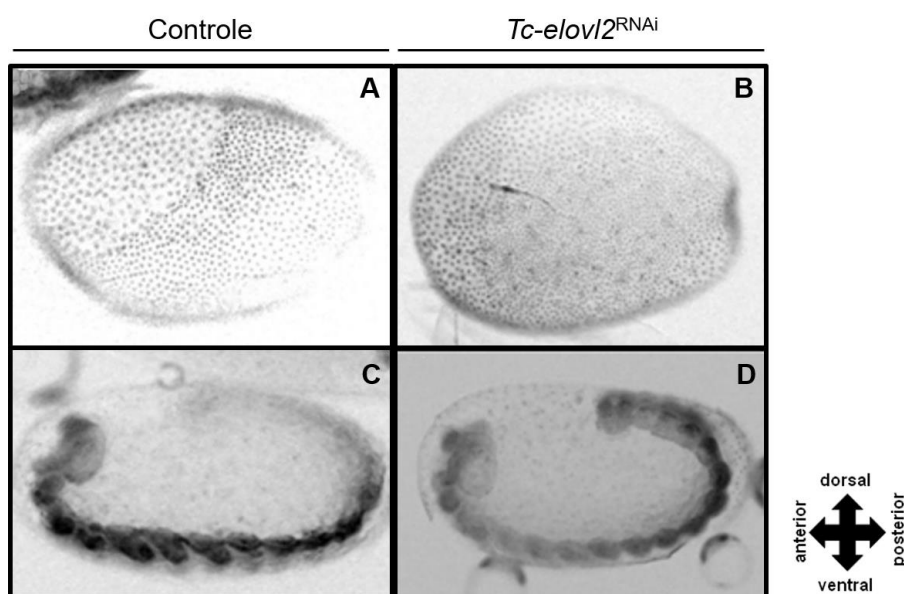
O *T. castaneum* possui em seu genoma 18 genes *elovl*, denominados de *Tc-elovl1* a *Tc-elovl18* (Vargas, 2015). O nosso grupo já vem investigando há alguns anos a presença e função dos genes *elovl* na embriogênese de *T. castaneum* (Vargas, 2015; 2019), inicialmente no contexto da expressão desses genes no papel da serosa em proteger os ovos contra a perda de água. Quatro desses genes (*Tc-elovl1*, *Tc-elovl2*, *Tc-elovl3*, *Tc-elovl4*) são expressos nas células da serosa durante a sua embriogênese inicial (Vargas, 2015). Após o silenciamento desses genes via pRNAi, foi comprovado que o gene *Tc-elovl4* está relacionado com a proteção do ovo contra a perda de água (Vargas, 2019). O silenciamento dos genes *Tc-elovl1*, *Tc-elovl3* e *Tc-elovl7* (esse último utilizado como controle negativo) não afetam o desenvolvimento dos ovos. Por outro lado, o gene *Tc-elovl2* apresentou um resultado inesperado: uma alta letalidade dos ovos, com valores de viabilidade próximos de 20% em qualquer umidade relativa (Figura 7). Como controle positivo deste experimento foi utilizado o gene *vermillion* de *T. castaneum* (*Tc-verm*), que quando silenciado afeta apenas a cor dos olhos deixando-os sem pigmentação (Lorenzen *et al.*, 2002). Como esperado, o silenciamento de *Tc-verm* não afetou a eclosão dos ovos mantidos em diferentes umidades relativas (Vargas, 2019) (Figura 7).



**Figura 7. Taxas de eclosão dos ovos silenciados para os genes *Tc-elovl1* a *Tc-elovl4*, *Tc-elovl7* e *Tc-verm* via pRNAi.** Fêmeas adultas de *Tribolium castaneum* foram injetadas com dsRNA e após 24 horas de postura seus ovos foram coletados e mantidos em estufa à 5% e 75% de umidade relativa até a avaliação da taxa de eclosão. n.s.: diferença não significativa; asterisco indica  $P < 0,0001$ , ambos de acordo com *Two-way ANOVA*. Fonte: retirado de Vargas, 2019.

Também foi avaliada a morfologia do embrião após o silenciamento de *Tc-elovl2* e, curiosamente, os ovos apresentam uma aparência normal e o embrião se desenvolve normalmente até o estágio de início da extensão da

banda germinal, o que corresponde a cerca de 1/5 da embriogênese do *T. castaneum* (Vargas, 2019) (Figura 8).



**Figura 8. Aspecto de embriões controle e após silenciamento de *Tc-elovl2* em estágios iniciais.** Embriões foram fixados e seus núcleos foram visualizados por microscopia de fluorescência após marcação com DAPI nos estágios de blastodermia celular diferenciado (**A, B**) e início da extensão da banda germinal (**C, D**). Nos painéis **A** e **B** é possível observar as células da serosa, mais espaçadas e com núcleos maiores, na região antero-dorsal. Nos painéis **C** e **D** é possível observar o embrião já segmentado, com os lóbulos cefálicos bem evidentes na região mais anterior. Painéis **A** e **C**: embriões controle, painéis **B** e **D**: embriões com fenótipo normal após silenciamento de *Tc-elovl2* via pRNAi. Fonte: retirado de Vargas, 2019.

Neste contexto, com o intuito de abranger diferentes informações sobre os genes *elovl* e devido à pandemia do Covid-19 (ocorrida entre janeiro de 2020 e maio de 2023 e que impossibilitou a realização do projeto original idealizado para este trabalho), esta tese foi dividida em três capítulos. O primeiro capítulo trata-se de uma revisão que apresenta informações gerais sobre as enzimas codificadas pelos genes *elovl*, as elongase, e todas as funções conhecidas dos genes *elovl* em insetos. No segundo capítulo trabalhamos a perspectiva de entender relações filogenéticas sobre genes *elovl* em insetos comparando com outros organismos pertencentes ao clado Ophistokonta. O terceiro capítulo apresenta a investigação do papel realizado pelo gene *Tc-elovl2* no ovo do besouro *T. castaneum* através de análises experimentais. Dessa forma, os dados obtidos a partir da investigação da funcionalidade e de aspectos evolutivos de genes da família *elovl* pode nos

ajudar na compreensão da importância das elongases em estágio embrionários e pós-embrionários de insetos.

## **2. CAPÍTULO 1 - Genes of very long chain fatty acids elongases (*e/ovl*) in insects: a Review**

Neste capítulo é apresentada uma revisão que descreve características gerais das proteínas elongases, a via de alongamento dos ácidos graxos em animais e todas as funções dos genes *e/ovl* em insetos descritas na literatura até o momento.

O manuscrito foi submetido a revista BMC Molecular and Cell Biology.

## **Genes of very long chain fatty acids elongases (*elovl*) in insects: a Review**

**Authors: Ulli Barros Oliveira<sup>1</sup>; Gustavo Lazzaro Rezende<sup>1,2,☉</sup>, Helena Carolina Martins Vargas<sup>1,☉</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

☉Corresponding authors

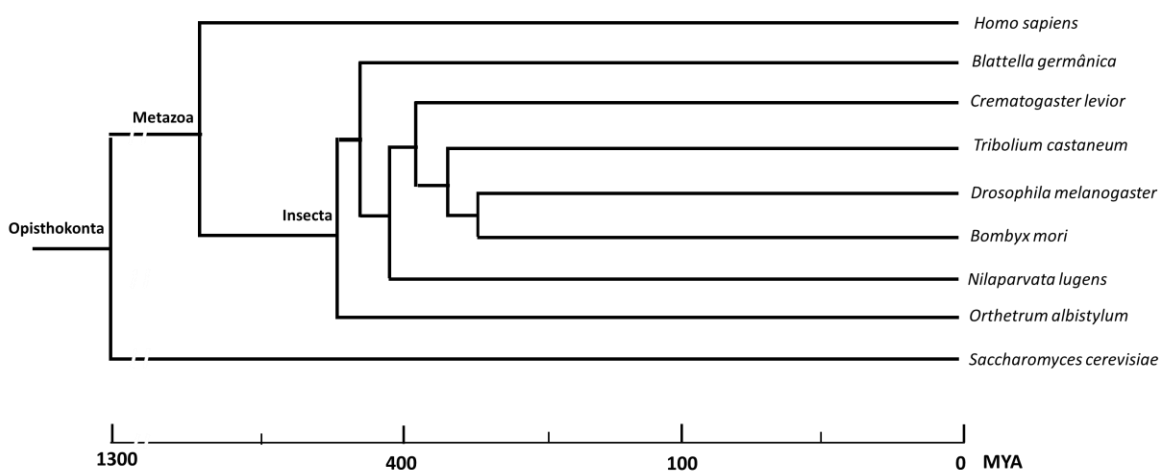
### **Abstract**

Fatty acids (FA) are a class of organic molecules composed of a carboxylic acid and an aliphatic structure composed of a chain of 4 to 36 carbons that can be classified according to the degree of unsaturation or length of the carbon chain. The FA synthesis pathway begins with the Acetyl-CoA Carboxylase enzyme, which produces malonyl-CoA, which is then used as one of the substrates for the Fatty Acid Synthase enzyme, which generates FAs of up to 14, 16 or 18 carbons. When there is a need for fatty acids with even longer chains, their synthesis occurs through the action of an elongation system that has four enzymes: a transferase, an oxidoreductase, a hydrolase and another oxidoreductase that synthesize very long chain fatty acids (VLCFA) from the addition of a two-carbon portion to the substrate. Given the versatility and relevance of fatty acids and the many genes related to their metabolism, this review focuses on the gene family that encodes the very long-chain enzyme 3-Oxoacyl-CoA Synthase (EC 2.3.1.199), also defined as ELO, ELOVL or elongase. Elongases are the first enzymes of the fatty acid elongation system, the transferase, that performs a condensation reaction, which is the limiting step. Elongases are present in eukaryotic organisms, with well-preserved motifs and a structure that has between 5 and 7 transmembrane  $\alpha$ -helix domains. At the end of the elongation pathway, synthesized VLCFA can undergo modification, giving rise to other classes of lipids which act in different biological ways. In insects, the elongated acyl-CoA are also precursors of saturated and unsaturated hydrocarbons (alkanes and alkenes) which in turn act in cuticular waterproofing and are precursors of some types of pheromones important for the mating or copulation processes. Also, elongases in insects contribute to other processes such as male fertility, signaling pathways related to immunity, pathological processes and the process of diapause. Despite the diversity of functions, the extent of these roles in insects is still unclear. Yeast and mammals have 3 and 7 elongases in their genomes, respectively, with well-described functions. Insects, on the other hand, present an immense variability of elongases in their genome: from 7 to 37 paralogs, according to the species analyzed here. Most of these genes have no known roles and more functional studies are needed in insects.

**Keywords:** GNS1/SUR4 domain, pheromone, hydrocarbon, lipid, very long chain fatty acid pathway

## 2.1. INTRODUCTION

The concept of fatty acids (FAs), what are their functions, how they are produced and the enzymes necessary for their production will be presented here. The EC number and nomenclature of each enzyme follows the IUBMB recommendation (McDonald *et al.*, 2009; McDonald and Tipton, 2021), but the most common names will also be used. Although this review is focused on insects, whenever necessary, knowledge obtained from yeasts and mammals, which belong to the taxon Ophisthokonta along with insects (Figure 9), will be used, since the elongases of these two types of organisms are the better studied.



**Figure 9. Phylogeny of Opisthokonta.** The phylogenetic relationships between selected Ophisthokonta species are shown. Phylogeny data and estimated divergence periods were obtained from timetree.org as of January 30, 2023. All species are mentioned in the text. MYA: Millions of years ago.

Then the following topics will be addressed: the process of elongation of fatty acids in animals (Item 2.2), the fate of the FA after being elongated (Item 2.3), characteristics of Elongase proteins and *elovl* genes (Item 2.4), the role of *elovl* genes in yeast and animals (Item 2.5) and the function of *elovl* genes in insects (Item 2.6).

Fatty acids are a class of organic molecules composed of a carboxylic acid and an aliphatic chain composed of 4 to 36 carbons (C4 to C36) (Bond *et al.*, 2016; Chapman, 2013; Lockey, 1988). They can be classified as Saturated Fatty Acids (SFAs) when there are only single bonds between the carbons, Monounsaturated Fatty Acids (MUFAs) when there is only one double bond between two carbons and Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) when double



bonds occur between two or more pairs of carbons (Bond *et al.*, 2016; Kihara *et al.*, 2011; 2012). Fatty acids are also classified according to the length of their carbon chain, as short, medium, long or very long chain FAs, although the size limits for each class diversify between authors, being loosely defined (e.g. Sassa and Kihara, 2014; Zheng *et al.*, 2017; Caspi, 2020). In any case, all FA obtained through the elongation system will be defined here as a Very Long Chain Fatty Acid (VLCFA), regardless of its size.

Animals obtain FAs either through the diet or through *de novo* synthesis (i.e. from the beginning). The first step in FA biosynthesis begins with the enzyme Acetyl-CoA Carboxylase (EC 6.4.1.2) which produces malonyl-CoA from the addition of a carboxyl group (which came from bicarbonate) to an acetyl-CoA molecule. Subsequently, this malonyl-CoA, along with another acetyl-CoA, will be used as a substrate by the Fatty Acid Synthase Complex (FASC, a large enzyme with seven distinct functional sites) (EC 2.3.1.85) originating butyryl-CoA, a fatty acyl-CoA with 4 carbon atoms (4C). Then, FASC synthesizes caproyl-CoA (6C) from butyryl-CoA and malonyl-CoA. Depending on the organism and the enzyme, FASC elongates the fatty acyl-CoA until molecules of 14, 16 or 18C (myristic, palmitic or stearic acid, respectively) are produced (Wakil *et al.*, 1983; Toke and Martin, 1996; Oh *et al.*, 1997). Insects have distinct FASC genes that are expressed in different tissues and for different physiological processes (Parvy *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2020). Biochemical assays in *Blattella germanica* and *Musca domestica* showed FASC activities in cytosolic and microsomal fractions. While the cytosolic FASC would be responsible for the synthesis of straight-chain FASC, the microsomal FASC would be responsible for the synthesis of methyl-branched AGs (Juaréz *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1997). Later, this was proved through genetic assays in *Drosophila melanogaster* (Chung *et al.*, 2014).

Unsaturated fatty acids are synthesized by modifying saturated fatty acids and, in animals, involve aerobic desaturase enzymes that insert double bonds at specific sites in the fatty acid chains. Specific unsaturated FAs can be obtained through diet or the action of different desaturases in the organism (Bond *et al.*, 2016; Castro, 2016; Wallis *et al.*, 2002).

If a given organism needs FAs (saturated or unsaturated) longer than those produced by FASC, these must be obtained from the diet (essential lipids) (Wallis *et al.*, 2002) or must be produced by the elongation system.

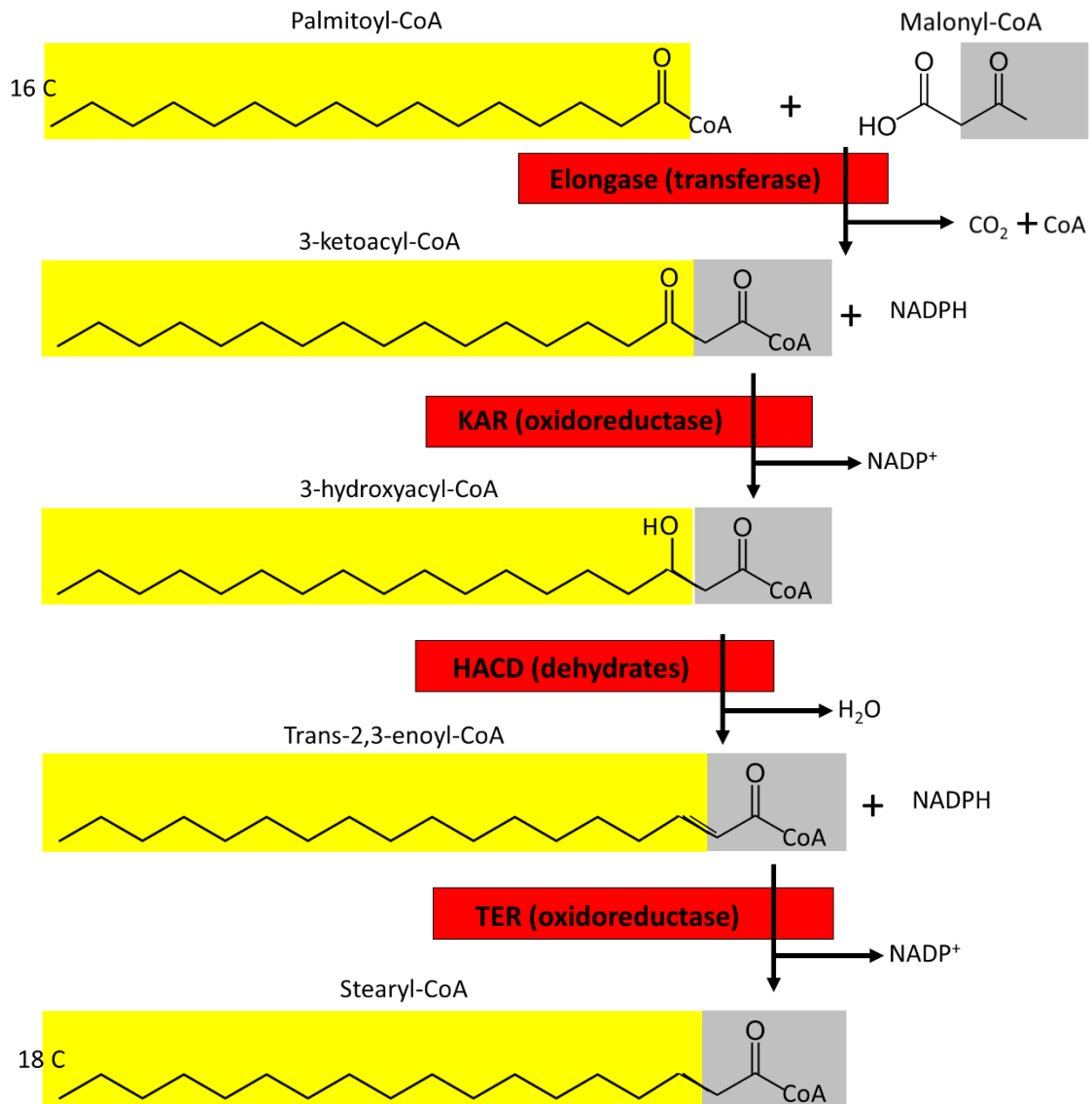
## 2.2. The fatty acid elongation system of animals

There are three fatty acid elongation systems in animals, separated by their subcellular location: endoplasmic reticulum, mitochondria, and peroxisomes (Bond *et al.*, 2016). The mitochondrial and peroxisomal systems are less well known and will not be discussed here. Before the elongation of fatty acids in the endoplasmic reticulum, the longest FA produced by FASC - palmitic acid (16C), for example - must be activated with the addition of a CoA by the action of the very long-chain acyl-CoA ligase (EC 6.2.1.3). Thereafter, the palmitoyl-CoA molecule is elongated by adding a two-carbon provided by malonyl-CoA in the presence of NADPH. Unlike the FASC system, the FA elongation system present in the endoplasmic reticulum is composed of the activity of four independent enzymes:

- 1) Very Long Chain 3-Oxoacyl-CoA Synthase (EC 2.3.1.199), a transferase also called Very Long Chain 3 Ketoacyl-CoA Synthase,  $\beta$ -Ketoacyl-CoA Synthase Very Long Chain, KCS, ELO, ELOVL or simply, **Elongase**;
- 2) Very Long Chain 3-Oxoacyl-CoA Reductase (EC 1.1.1.330) an oxidoreductase also called Very Long Chain 3-Ketoacyl-CoA Reductase; very long chain  $\beta$ -ketoacyl-CoA reductase, KCR or **KAR**;
- 3) Very long chain (3)-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydratase (EC 4.2.1.134) a hydrolase also called  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA Dehydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydratase or **HACD**;
- 4) Very Long Chain Enoyl-CoA Reductase (EC 1.3.1.93) another oxidoreductase, also called trans-2,3-Enoyl-CoA Reductase or **TER**.

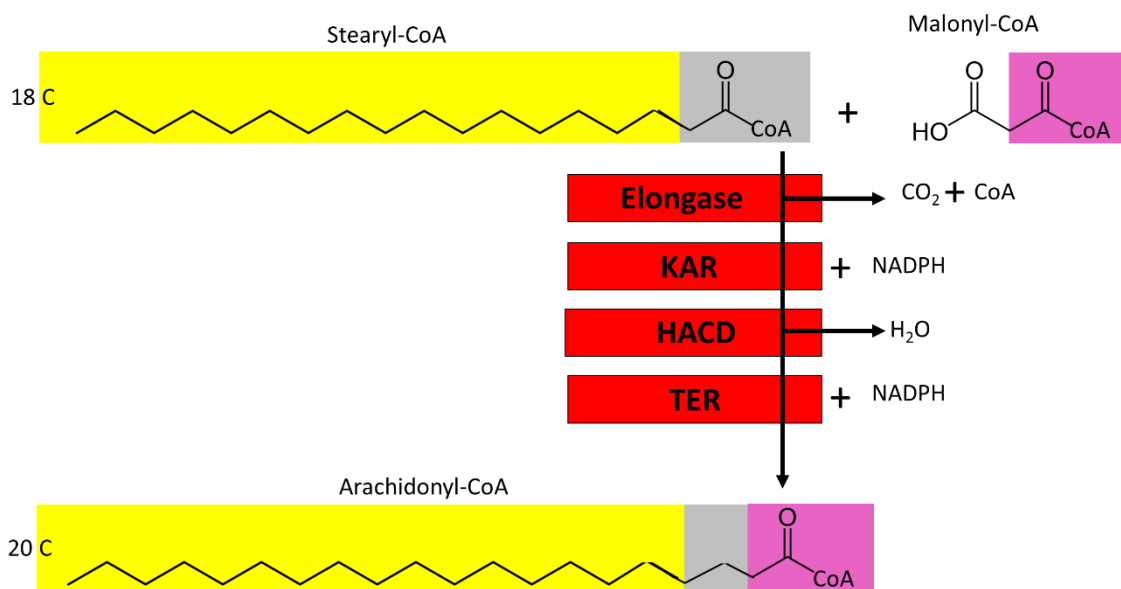
The first enzyme in the FA elongation system, Elongase, performs the initial condensation step. Again using palmitoyl-CoA (16C) as a substrate example, Elongase forms 3-ketoacyl-CoA through condensation of malonyl-CoA and palmitoyl-CoA with the release of CO<sub>2</sub> and CoA. In the second step, KAR reduces 3-ketoacyl-CoA and forms 3-hydroxylacyl-CoA with NADPH as an electron donor. Subsequently, HACD dehydrates 3-

hydroxylacyl-CoA and forms trans-2,3-enoyl-CoA. Finally, TER reduces trans-2,3-enoyl-CoA with NADPH as an electron donor and the final product is formed: stearoyl-CoA, an 18-carbon molecule (Figure 10).



**Figure 10. Elongation pathway of very long chain fatty acids.** The four steps of the fatty acid elongation pathway and their respective enzymes are shown in red boxes: the condensation performed by Elongase; the first reduction performed by KAR; dehydration performed by HACD and the second reduction performed by TER. In this example, the initial acyl-CoA has 16 carbons. The other substrates are malonyl-CoA and two NADPH molecules. The yellow background indicates the 16-carbon chain of the initial substrate and the gray background indicates the two additional carbons from malonyl-CoA.

Elongation of FA containing 20 or more carbons occurs by repeating the elongation pathway now with the newly formed 18-carbon stearoyl-CoA being the substrate of the first enzyme, Elongase (Bond *et al.*, 2016; Kihara *et al.*, 2012; Jakobsson *et al.*, 2006) (Figure 11).



**Figure 11. Second cycle of the very long chain fatty acid elongation pathway.** The four steps of the second cycle of the fatty acid elongation pathway after the first cycle shown in Figure 11 are summarized here. The color codes are the same as in Figure 11 and the pink background indicates the two carbons originating from malonyl-CoA added in this second cycle. Compounds that can be formed from the synthesized very long chain fatty acids are indicated in the white box.

It is important to note that different elongases act on VLCFAs of different sizes and with different saturation levels (see item 2.5 below) so, when the elongation cycle restarts, the elongase that will participate in this new cycle may be different from the elongase that participated in the previous cycle.

### 2.3. Fatty acid fate after being elongated

After being elongated, the formed acyl-CoA molecules can proceed to the formation of other lipids: wax esters, free fatty acids, free alcohols, glycerophospholipids, ceramides or other sphingolipids (Castro *et al.*, 2016; Kihara *et al.*, 2012; Jakobsson *et al.*, 2006; Juarez and Fernandez, 2007; Uchida and Holleran, 2008; Sassa and Kihara, 2014). In insects, the elongated acyl-CoA are also precursors of the formation of saturated and unsaturated hydrocarbons (alkanes and alkenes) which in turn act in the waterproofing of the exoskeleton and are precursors of some types of pheromones (Chapman, 1998). In the formation of hydrocarbons, very long chain acyl-CoA are converted into aldehydes by the action of a reductase and then the aldehydes are reduced and decarbonylated by the action of a

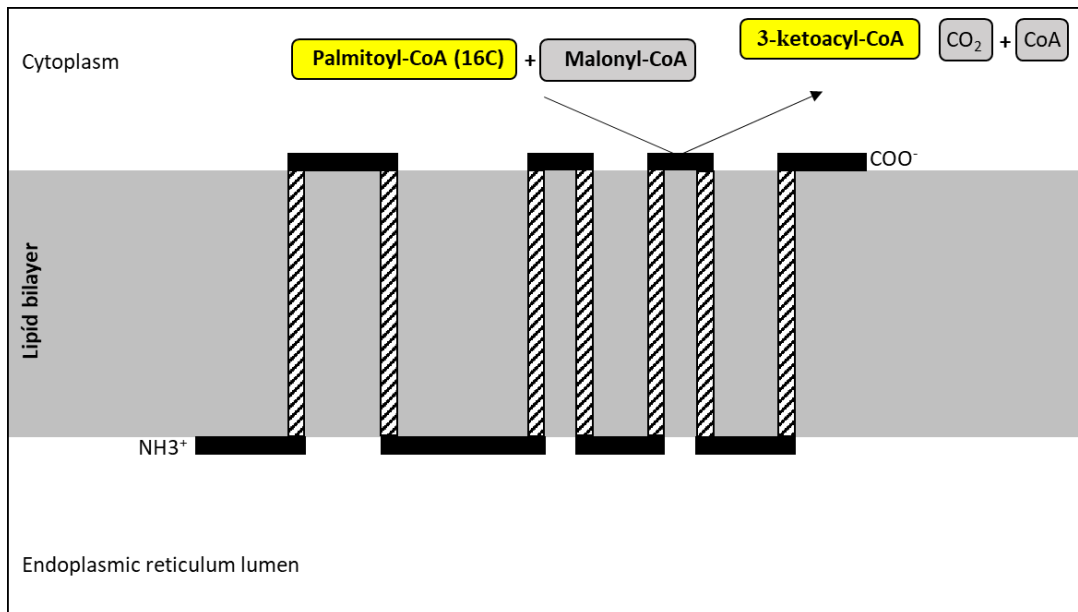
P450 decarbonylase (e.g. CYP4G), forming hydrocarbons (Ginzel and Blomquist, 2016).

If the very long-chain acyl-CoA needs to be transformed into free fatty acid, without Coenzyme-A, the action of palmitoyl-CoA hydrolase/long-chain fatty-acyl-CoA hydrolase/acyl-CoA thioesterase 2 (EC 3.1.2.2) is required, which removes Coenzyme-A.

#### **2.4. Characteristics of Elongase proteins**

All elongases are contained in the ketoacyl synthase (KS) superfamily, and animal and fungal elongases belong to the KS5 family (Chen *et al.*, 2011). Elongase proteins are very hydrophobic and display a motif rich in histidine (LHXXHH) and other well-preserved motifs (KxxExxDT, HxxMYxYY and TxxQxxQ) (Figure 12). Structure predictions indicate that Elongase proteins generally have between 5 and 7 transmembrane  $\alpha$ -helix domains (Bond *et al.*, 2016; Jakobsson *et al.*, 2006; Leonard *et al.*, 2004) (Figure 13), which is confirmed by the first structure recently obtained for human *elov17*, which has 7 transmembrane domains (Nie *et al.*, 2021). The condensation step catalyzed by Elongase is the limiting step of the reaction and substrate selectivity.





**Figure 13. Scheme of the transmembrane profile of an elongase enzyme.** The scheme shows the seven transmembrane domains of elongase embedded in the membrane of the endoplasmic reticulum. The color codes of the substrates and products are described in the legend of Figure 11.

Elongase enzymes are encoded by genes of the *elovl* family, which are found in different amounts in the genome of different organisms and they differ in their substrate specificity, considering chain length and number of unsaturations.

## 2.5. The function of the *elovl* genes in yeast and mammals

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has three genes belonging to the *elovl* family (*ELO1*, *ELO2* and *ELO3*). *ELO1* is important for synthesizing fatty acids by converting myristoyl-CoA (C14) into palmitoyl-CoA (C16) (Toke and Martin, 1996). *ELO2* is necessary for the formation of FAs up to C24:0 and *ELO3* is necessary to synthesize C26:0 (Oh *et al.*, 1997; Paul *et al.*, 2006). In *Ogataea polymorpha* (Hansenula), the *HpELO1* gene, a homologue of *ELO3* from *S. cerevisiae*, is indispensable to produce C24:0 and the loss of this gene causes hypersensitivity to zymolyase, a complex of enzymes that degrade the yeast cell wall (Prasitchoke *et al.*, 2007a). In the same organism, *HpELO2* would be involved in the elongation of C18:0 for very long chain fatty acids with 24 and 26 carbons (Prasitchoke *et al.*, 2007b). In *Schizosaccharomyces pombe*, *ELO2* is essential for cell viability and important for the composition of

phytoceramides (a conjugated molecule of C20:0 phytosphingosine and C24:0 fatty acid) (Kinuagsa *et al.*, 2019).

In mammals, seven elongase genes, *elov1* - *elov7*, have been described. The *elov1* gene is relevant for the synthesis of ceramides and other sphingolipids and directly affects the myelination of the nervous system (Bond *et al.*, 2016). Isokawa *et al.* (2019) analyzed *elov1* mutant mice and identified reduced levels of galactosylceramides, an important molecule for myelin formation. The mutant mice showed a decreased postnatal survival rate and some died of startle epilepsy.

*Elov2* directly affects the synthesis of FAs with three or more unsaturations and the *elov2* knockdown in mice leads to infertility in males and hepatic steatosis (popularly called 'fat liver') (Pauter *et al.*, 2014). A similar phenotype was observed when the *elov5* and *elov6* genes were deleted (Bond *et al.*, 2016). The *elov3* gene is important for the correct structure of the skin barrier in rats (Westerberg *et al.*, 2006). The *elov4* gene is highly expressed in retinal photoreceptor cells (cones and rods) and deletion of the *elov4* gene results in macular degeneration of the eye (Zhang *et al.*, 2001). This same gene has a direct role in the waterproofing of the epidermis. In newborn mice, deletion of *elov4* affects the permeability of the epidermis, leading to dehydration and death a few hours after birth (Cameron *et al.*, 2007; Vasireddy *et al.*, 2007). The *elov17* gene has been described to be associated with FA elongation of 18-22 carbons. The deletion of this gene leads to a decrease in the growth of cancer cells (Tamura *et al.*, 2009).

There is no logical order for the naming and numbering of elongase genes among different organisms. Thus, the *S. cerevisiae* *ELO1*, *ELO2* and *ELO3* genes are phylogenetically close to the mammal *elov3* and *elov6* genes and all of these are more distant from the other mammalian genes (*elov1*, *elov2*, *elov4*, *elov5* and *elov7*) (Zheng, *et al.*, 2017; Zuo *et al.*, 2018). Likewise, the numbers given to the different insect *elovl* genes are not necessarily related to the numbers given to the yeast and mammalian elongase genes.

## 2.6. Functions of *elovl* genes in insects



Unlike what is observed in mammals and fungi, the group of insects has a varied number of *elovl* genes in their genomes, which, in the sampled species, varies from 7 to 37 paralogs (Table 1). The *elovl* genes are well described and known in mammals, but comparatively few works describe their functions in insects. The fruit fly, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) which has 20 paralogs of *elovl*, has only six genes with their known functions (*noa*, *elo68α*, *bond*, *eloF*, *dELOVL* and *sit*). Here the functions of insects *elovl* genes described so far are reported. Most works in insects relate the role of *elovl* genes with the reproductive process, communication through pheromones, cuticular waterproofing, the immune system, pathological processes and diapause. In this way, the following topics will be organized according to the biological process. It is worth mentioning that *noa* (also known as *Baldspot* or *elovl6*) is the best described *elovl* gene in insects and is involved in different processes.

**Table 1.** Number of *elovl* genes in different insect species

Order	Species	Number of <i>elovl</i> genes	Reference
Odonata	<i>Orthetrum albistylum</i>	17	Futahashi et al. 2019
Orthoptera	<i>Locusta migratoria</i>	7	Zhao et al., 2020
Blattodea	<i>Blattella germanica</i>	24	Pei et al., 2021
Hemiptera	<i>Nilaparvata lugens</i>	20	Li et al., 2019
Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i>	15	ENSEMBL, 2023
Hymenoptera	<i>Crematogaster levior</i>	23	Hartke et al., 2019
Hymenoptera	<i>Lasius niger</i>	9	Hartke et al., 2019
Hymenoptera	<i>Vollenhovia emeryi</i>	37	Hartke et al., 2019
Coleoptera	<i>Tribolium castaneum</i>	18	Vargas, 2019
Lepidoptera	<i>Danaus plexippus</i>	17	ENSEMBL
Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i>	13	Zuo et al., 2018
Lepidoptera	<i>Plutella xilostella</i>	19	Zuo et al., 2018
Diptera	<i>Anopheles gambiae</i>	20	ENSEMBL
Diptera	<i>Drosophila melanogaster</i>	20	ENSEMBL

### 2.6.1. Reproduction

Chertemps *et al.* (2005) showed that the *elo68α* gene is expressed only in adult males of *D. melanogaster*, specifically in the testes and ejaculatory bulbs. This gene acts in the elongation process of myristoleic (14:1) and palmitoleic (16:1) unsaturated fatty acids, synthesizing, respectively, palmitoleic

acid (16:1) and vaccenic acid (18:1). The authors argue that *elo68α* may be involved in the synthesis of the male pheromone vacenyl acetate (20:1).

Jung *et al.* (2007) reported the expression of the *noa/Baldspot/elovl6* gene in the gonads of both sexes of *D. melanogaster* and in smaller amounts in other parts of the fly. In testes, *noa/Baldspot/elovl6* expression was detected in cyst cells and terminal epithelium. Deletion of *noa/Baldspot/elovl6* targeted at cyst cells led to male sterility indicating that its role is essential for male fertility. In the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), the silencing of *noa/Baldspot/elovl6* mainly affected tissues such as the ovary and testis, causing a 32% reduction in egg production by silenced females when compared to the control (Li *et al.*, 2011).

The *elovl* gene called *Bond* in *D. melanogaster* is important for the elongation of fatty acids in the final stages of spermatocyte cell division. *Bond* mutant males have defects during the cytokinesis process of meiotic divisions (Szafer-Glusman *et al.*, 2008). During cytokinesis in animal cells, a structure composed of actin-myosin filaments called the contractile ring is formed, which, when contracted in the strangulation movement of the cell, forms the cleavage groove necessary for successful cell division. *Bond* is essential in the process of curvature of the plasmatic membrane and in its interaction with the activity of the contractile ring, for the subsequent formation of the cleavage groove and correct cytokinesis in spermatocytes of *D. melanogaster*.

In addition to its essential role in spermatocyte cytokinesis, the *Bond* gene of *D. melanogaster* also acts in the synthesis process of the male sex pheromone (3R,11Z,19Z) -3-acetoxy-11,19-octacosadiene-1-ol (also known as CH503) (Ng *et al.*, 2015). *Bond* is expressed in the ejaculatory bulb, which is one of the main sites of pheromone synthesis in males, and in the male reproductive organs that are attached to the ejaculatory bulb. Both males silenced for *Bond* via RNAi and mutants for the same gene lost the ability to produce the pheromone, and females mated with these males produced a smaller number of offspring.

The *eloF* gene acts in the production of cuticular hydrocarbons that on its turn act as pheromones of females of different species of the genus *Drosophila*. The silencing of *eloF* in *D. melanogaster* females leads to changes in several

parameters of the courtship ritual, such as a decrease in copulation attempts by males (Chertemps, 2007). From heterologous expression in yeast, the author showed that *eloF* can elongate saturated and monounsaturated fatty acids up to C30. It has also been shown that *eloF* acts on the synthesis of pheromone hydrocarbons in female *Drosophila sechellia* and on the tendency of males of *Drosophila simulans* and *D. melanogaster* to mate (Combs *et al.*, 2018; Lin *et al.* 2018).

In *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) 13 *elovl* genes are found with varied expression levels in different tissues. Four of these genes (BGIBMGA005156, BGIBMGA000842, BGIBMGA010921 and BGIBMGA012702) are expressed in reproductive organs such as the ovary and testis and were identified as orthologs of the *eloF*, *elo68 $\alpha$* , *Bond* and *noa* genes of *D. melanogaster*, which are involved in reproductive processes as previously described (Zuo *et al.*, 2018).

In *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) 24 *elovl* genes were identified, named from *BgElo12* to *BgElo24*. The *BgElo12* gene was shown to be important for the synthesis of sexually dimorphic cuticular hydrocarbons. *BgElo12* silencing drastically decreased the amounts of the female contact sex pheromone 3,11-DimeC29-2-one (essential for the performance of male courtship behavior) and its precursor cuticular hydrocarbon 3,11-DimeC29, in addition to masculinizing the profile of female hydrocarbons. The results also indicate that the sex differentiation genes *Transformer* and *Doublesex* regulate the expression of *BgElo12* (Pei *et al.*, 2021).

### **2.6.2. Waterproofing**

The exoskeleton that covers the body of insects performs functions related to the cuticular layers that compose it. The procuticle, which is the innermost and thickest layer, is formed by proteins and chitin and is responsible for the rigidity and support of the insect's body. The outermost layer, the epicuticle, is made up of proteins, lipoproteins, lipids, and other hydrophobic compounds. The epicuticle is much thinner than the procuticle but is nevertheless composed of four layers, from innermost to outermost: inner epicuticle; outer epicuticle; wax layer and cement. The lipids present in the

epicuticle vary between the different stages of development of the same species and between species. The following classes of lipids have been described as present in the epicuticle: free fatty acids; wax esters; triacylglycerides and sterols. In addition to lipids, other hydrophobic compounds essential for cuticular waterproofing are also present in the epicuticle: hydrocarbons, alcohols, aldehydes and ketones (Lockey, 1988; Chapman, 1998). In addition to the outer part of the insect body, the cuticle also covers structures originating from ectodermal invaginations, such as the foregut, hindgut and tracheal system (Chapman, 2013). Some studies have shown the role of *elovl* genes in the synthesis of very long chain fatty acids, which are precursors of cuticular hydrocarbons that are important for insect cuticular waterproofing.

In *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), the brown leafhopper pest of rice, 20 elongases were identified in its genome. The silencing of these genes showed that four of them act directly in the synthesis of different hydrocarbons, mainly 29-carbon alkanes, which are adhered to the cuticle of the tegument and are essential in the water retention process (Li *et al.*, 2019).

The role of *elovl* genes in cuticular impermeability was also studied in the grasshopper *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) by Zhao *et al.* (2020). Of the seven *elovl* genes identified in different tissues, the *LmELO7* gene showed almost exclusive expression in the insect's tegument and its silencing led to a reduction in the synthesis of total and internal cuticular hydrocarbons, especially 29-carbon alkanes. In fourth-instar nymphs, the stage used to evaluate the biological role of *LmELO7*, the main reduction occurred in C29 alkanes and C29-C31 branched methyl-alkanes. Furthermore, silencing of *LmELO7* caused immature death during ecdysis or in the first hours after ecdysis, due to increased cuticle permeability and subsequent desiccation.

It is relevant to note that despite the evolutionary distance of about 380 million years since the last common ancestor between the hemiptera *N. lugens* and the orthoptera *L. migratoria*, *elovl* genes in these two insects were involved in the synthesis of 29-carbon alkanes important for cuticular waterproofing of both, which indicates that this function of *elovl* is conserved for millions of years.

In another study carried out by Pei *et al.* (2022), the authors reported the importance of two genes that encode a FASC and an Elongase (*BgFas3* and *BgElo1*) involved in the synthesis of fatty acids for waterproofing the respiratory system in *Blattella germanica*. After silencing the genes, the insects were immersed in water and the results showed that the cockroaches had difficulty recovering from drowning due to the entry of water into the respiratory system, compromising the thoracic and abdominal spiracles. The increase in the expression of the hypoxia response genes *BgHIF-1 $\alpha$*  and *BgScylla* after the silencing of *BgFas3* and *BgElo1* contributes to the strengthening of the hypothesis of the role of these genes in preventing water loss in the respiratory system of *B. germanica*.

Regarding the beetle *Tribolium castaneum*, it was reported that the *elovl* gene called *Tc-elovl4*, when silenced via parental RNAi, decreases egg viability in conditions of low relative humidity (5%). In other words, *Tc-elovl4* would have an important role in waterproofing the *T. castaneum* egg, acting in desiccation resistance (Vargas *et al.*, unpublished results).

### 2.6.3. Diapause

Urbanski *et al.* (2010) investigated the amount and length of hydrocarbons present on the surface of diapause eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), comparing populations from temperate and tropical climates and long and short days. Analysis of the results reported that eggs in diapause in temperate regions had significantly higher amounts of hydrocarbons on their surface and lower rates of water loss, as well as higher rates of expression of the *elovl* gene when compared to eggs that were not in diapause. Both eggs that were in diapause and those that were not, in temperate regions, had very long chain hydrocarbons and did not differ in the length of the carbon chains. Differences in the amount of hydrocarbons and rates of water loss did not occur in eggs from tropical regions.

The work by Reynold *et al.* (2012) also reports the difference in expression levels of the *elovl* gene called *face* (Fatty Acyl-CoA Elongase) in *Ae. albopictus* three and six days after oviposition. A higher rate of *face* expression was also observed in embryos in diapause compared to embryos without

diapause, as well as higher amounts of total lipids. The authors suggest that *face* action may be more related to the synthesis of surface hydrocarbons that act in resistance to desiccation than to the storage of fuel lipids in larvae in diapause.

Four genes involved in fatty acid synthesis were analyzed by Xiang *et al.* (2021) in non-diapause, diapause and post-diapause stages in the species *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Among these genes, the *elovl* gene called *CsELO* showed higher expression rates in the early stages of diapause, characterized as early diapause. *CsELO* silencing resulted in a decrease in total lipids and abdominal lipid accumulation in *C. septempunctata*. The authors suggest that *CsELO* is important in the accumulation of lipids during the preparation phase of diapause, a phase that requires high amounts of energy reserves.

#### **2.6.4. Other functions**

Insect cuticular lipids contain antimicrobial substances that contribute to the immune defense against pathogenic microorganisms (Chapman, 2013). The involvement of *elovl* genes in signaling pathways related to immunity in insects has also been investigated by some authors. The results obtained by Dong *et al.* (2015) demonstrated that the *noa/Baldspot/elovl6* gene in *Bactrocera dorsalis* causes activation of the *MyD88* and *defensin* genes that act in the Toll pathway and of the *relish* and *diptericin* genes in the Imd pathway. The data obtained may be related to the fact that *noa/Baldspot/elovl6* acts on the biosynthesis of lipids that are probably involved in signaling mechanisms within immune cells. In addition, the authors reported the expression of *noa* in all stages of development and in different tissues such as the head, intestine, fat body, testes and ovaries, with higher expression rates in the testes and ovaries.

In the caterpillar *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) it was demonstrated that the *SeEloV-B* gene acts in the synthesis of arachidonic acid (20:4), the main precursor of eicosanoids, a compound used in immune responses against pathogens. After silencing *SeEloV-B* via RNAi, the eicosanoid-mediated immune response was suppressed in *S. exigua* (Hasan *et al.*, 2019).

In *D. melanogaster* the *noa/Baldspot/elovl6* gene is also involved in endoplasmic reticulum stress a states caused by excess proteins with irregular folding in the organelle, which can generate a variety of diseases. One of the diseases caused by endoplasmic reticulum stress is retinal degeneration, caused by excess rhodopsin with poor folding in the eyes of fly larvae. In order to reverse stress, the cell activates the so-called misfolded protein response to UPR (Unfolded Protein Response). The UPR is a cytoprotective response, regulated by the IRE1 $\alpha$ , ATF and PERK proteins, which, when activated, induce a reduction in protein translation and control of protein folding (Welihinda *et al.*, 1999). The elongase encoded by *noa/Baldspot/elovl6* synthesizes stearate (C18) from palmitate (C16), which at high levels in the cell alters the functioning of proteins involved in the UPR pathway, inducing stress in the reticulum, which in turn leads to retinal degeneration. *Noa/Baldspot/elovl6* silencing decreases retinal degeneration (Palu and Chow, 2018). The study also points to the performance of *noa/Baldspot/elovl6* as a potential regulator of other diseases generated by endoplasmic reticulum stress, which can range from degenerative diseases to metabolic disorders.

The work by Gordon *et al.* (2018) tested the performance of the *dELOVL* gene from *D. melanogaster* in adrenoleukodystrophy (ALD), a sex-linked neurodegenerative disease that is popularly known as Lorenzo's disease. ALD is caused by a mutation in the peroxisomal transporter protein, which is responsible for transporting substances such as VLCFAs within cells. The authors identified the *Drosophila dELOVL* gene as important in the development of ALD. The silencing of *dELOVL* caused degenerative defects in the retina of flies replicating the phenotypes in humans. The experiments showed that changes in two other genes related to VLCFA metabolism (FA transporter and very long chain acyl-CoA ligase - E.C. 6.2.1.3) in brain tissues also result in ALD.

The *noa/Baldspot/elovl6* gene also plays an important role in mitochondrial morphology in *D. melanogaster* cells (Senyilmaz *et al.*, 2015). The elongase encoded by *noa/Baldspot/elovl6* acts in the production of stearate (C18) (as described above). Mutant flies for *noa/Baldspot/elovl6* presented the same amount of mitochondria as normal flies, but their morphology is altered.

Mitochondria in normal flies have a tubular morphology, whereas in mutant flies, mitochondria are fragmented due to reduced levels of 18-carbon fatty acids and their function is impaired. This alteration resulted in the death of the larvae.

Also in *D. melanogaster*, an *elovl* gene called *sit* (stuck in traffic) is expressed in the prothoracic gland and participates in the production of steroids. Larvae of flies that do not express *sit* in the prothoracic gland have lower levels of total ecdysteroids, higher presence of lipid droplets containing cholesterol in the prothoracic gland and higher levels of cholesterol in the body. *D. melanogaster* larvae that do not express *sit* have delayed pupation and exaggerated growth in pupal size (Danielsen *et al.*, 2016).

The function of two *elovl* genes called *AeELO2* and *AeELO9* was studied in larval and adult stages of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by Chen *et al.* (2023). After RNAi silencing of *AeELO2*, 2nd and 4th instar larvae showed abnormal moulting and a delay in the pupation process. The same did not occur with the silencing of *AeELO9*. On the other hand, both *AeELO2* and *AeELO9* silencing decreased hatching rate and egg length of *A. aegypti*. Moreover, in adult mosquitoes with the silenced *AeELO2* gene, cuticle elasticity was compromised after oviposition, whereas mosquitoes with silenced *AeELO9* presented eggs without larvae.

A study carried out with *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) showed that ten elongases are expressed in different stages of development of these bees and there is a correlation of these elongases with different classes of hydrocarbons present in the cuticle of each of these stages. The study also identified a variation between the types of hydrocarbons deposited in the cuticle of individuals in immature and mature stages, indicating that the different stages of development of *A. mellifera* require different classes of hydrocarbons for their survival and possibly also require different elongases (Falcon *et al.*, 2014).

Genomic analysis of the neotropical ant *Crematogaster levior* (Hymenoptera: Myrmicinae) showed a greater amount of elongase genes (n=23) than other ant species, such as *Lasius niger* (Hymenoptera: Formicidae) which has only nine elongases (Table 1). *Crematogaster levior* presents a great diversity of hydrocarbon classes present on the tegument surface, which may explain the large number of genes related to hydrocarbon synthesis, such as



elongases. The cuticular hydrocarbons of this ant species are extremely important in aiding chemical communication with another species in which it mutualistically shares its nest (Hartke *et al.*, 2019).

In *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), the functional characterization of two *elovl* genes (*TmELO1* and *TmELO2*) showed a generalized expression pattern in all developmental stages of both sexes of the beetle. The two genes act on the synthesis of fatty acids of different sizes. While *TmELO1* synthesizes very long chain fatty acids (mainly those with 20 carbon atoms), *TmELO2* synthesizes fatty acids characterized as long chain (mainly those with 16 carbon atoms). Only loss of *TmELO1* function causes larval mortality, indicating that very long-chain fatty acids are essential for *T. molitor* survival (Zheng *et al.*, 2017).

In *Bombyx mori*, four *elovl* genes are expressed in the gland that produces the silk cocoon. The relative expression of these genes with strains that had high or low silk cocoon weight indicated that only one of these *elovl* genes (GIBMGA000424/Bmelo424) is related to cocoon shell weight: strains that have lower cocoon shell weight express more GIBMGA000424/Bmelo424 (ZUO *et al.*, 2018). Subsequently, the authors evaluated the role of another *elovl* gene, *Bmelo12*, in silk production. Unlike GIBMGA000424/Bmelo424, *Bmelo12* is not expressed in the gland that produces the cocoon, but in developmental stages that are important for silk production. Overexpression of *Bmelo12* in *B. mori* females increases silk production by 9.6% (Zuo *et al.*, 2022).

In the dragonfly *Orthetrum albistylum* (Odonata: Libellulidae), there is a strong correlation between the expression of the *elovl17* gene and the distribution of very long-chain methyl ketone, one of the main constituents of the wax that partially covers the epidermis of this insect and has the function of reflecting light ultraviolet and visible light (Futahashi *et al.*, 2019). The work also reports the difference between the sexes and different stages of development in the place where the wax is deposited in the dragonfly epidermis according to the variation in the habitat in which each specimen lives. This suggests that the wax is important for communication in the mating process and in the protection of regions of the insect that require greater protection against UV rays.

Li *et al.* (2019) reports the presence of six *elovl* genes expressed in the fat body of the fly *Procecidochares utilis* (Diptera: Tephritidae). From phylogenetic analysis, these genes were separated into three clades. In one of the clades is found the *elovl* genes Unigene15322, Unigene25406, Unigene10414 and Unigene1062, in another the Unigene3318 gene and in another clade it includes the Unigene19540 gene. The specific function of these genes in *P.utilis* has not been investigated.

## 2.7. FINAL CONSIDERATIONS

- 1) Studies on *elovl* genes in insects make it possible to understand how members of a single gene family are capable of exercising such diverse functions within the same species and between different species;
- 2) Some functions of *elovl* genes are so conserved that they occur in a similar way in orders of insects separated by hundreds of thousands of years, or even between insects and mammals, as is the case of waterproofing;
- 3) Some of the functions performed by the *elovl* genes in insects are so important that they are essential for survival at a certain stage of life or even for a greater ability to leave descendants;
- 4) It is worth highlighting the studies that point to the performance of *elovl* genes as a potential regulator of neurodegenerative diseases such as those related to endoplasmic reticulum stress and adrenoleukodystrophy. These studies open a window for the future use of these genes for therapeutic purposes;
- 5) Despite the large number of *elovl* genes present in insects, few insect *elovl* genes have known functions, which makes us question what would be the biggest obstacle and/or difficulty in studying this family of genes in these organisms;
- 6) The use of reverse genetics techniques such as gene silencing via RNAi and gene editing via CRISPR are examples of methods that can help in obtaining knowledge of the functions of *elovl* genes and understanding the metabolic complexity of very long-chain fatty acid pathways regulated by these genes in insects;

- 7) An important issue to be resolved is the nomenclature of *e/ovl* genes, as the lack of standardization makes it difficult to comparatively study these genes in different species of organisms.

### **3. CAPÍTULO 2 – Diversidade e evolução das elongases de insetos: uma perspectiva dentro de Opisthokonta**

Este capítulo descreve os resultados sobre a filogenia das elongases de insetos obtidos através da análise de 293 sequências curadas de elongases de 19 espécies pertencentes ao grupo monofilético dos Opisthokonta.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Os genes de elongase são encontrados exclusivamente em organismos eucariotos e cumprem a função, nestes, de sintetizar ácidos graxos de cadeia muito longa que são empregados para variadas funções biológicas (Capítulo 1). Os organismos que possuem elongases melhor estudadas são os mamíferos, que possuem sete elongases (ELOVL1 a ELOVL7) (Bond *et al.*, 2016). A Figura 14 mostra a relação filogenética das elongases de mamíferos. Essas relações filogenéticas são utilizadas como referência por parte de literatura e também será empregada neste trabalho.

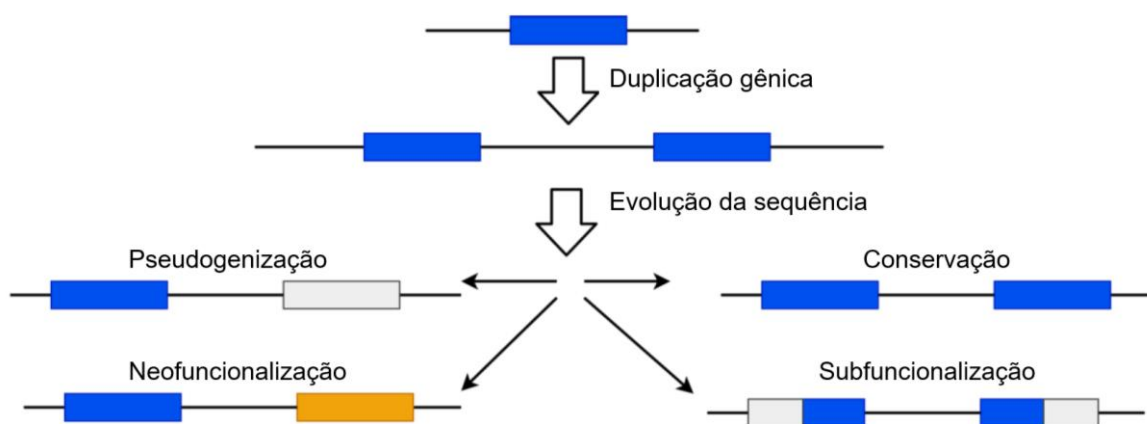


**Figura 14. Árvore filogenética das elongases (ELOVL) de mamíferos.** As elongases se agrupam em três clados: um clado ELOVL3/6 , um clado ELOVL2/5/4, que se divide nos subclados ELOVL2/5 e ELOVL4 e por último o clado ELOVL1/7. Fonte: adaptado de Matsumoto *et al.*, 2012.

Estudos com vários organismos eucariotos mostraram que diferentes elongases atuam em vias de alongamento que geram produtos muito diversos a partir de substratos com diferentes tamanhos de cadeias e graus de insaturação. Em mamíferos, das sete elongases existentes, quatro (ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6 e ELOVL7) estão envolvidas na biossíntese de AGs saturados (SFAs - do Inglês *Saturated Fatty Acids*) e AGs monoinsaturados (MUFAs - *Monounsaturated Fatty Acids*), uma (ELOVL4) na síntese de SFAs e AGs poli-insaturados (PUFAs - *Poly Unsaturated Fatty Acids*) e as outras duas (ELOVL2 e ELOVL5) participam apenas do alongamento de PUFAs (Agbaga *et al.*, 2008; Jump, 2009; Tamura *et al.*, 2009). As funções biológicas descritas para essas elongases foram apresentadas no Capítulo 1. Em peixes já foram descritas sete elongases, das quais, quatro (ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6 e ELOVL7), assim como em mamíferos, sintetizam SFAs e MUFAs e as outras

três (ELOVL2, ELOVL4 e ELOVL5), PUFAs. Os autores sugerem que essas elongases são importantes para o desenvolvimento embrionário nas espécies *Danio rerio* e *Siganus canaliculatus* (Monroig *et al.*, 2009; Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2011; Monroig *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2017; Ferraz *et al.*, 2020). No molusco da espécie *Octopus vulgaris* apenas uma elongase foi estudada (ELOVL4) e esta é importante para a síntese de PUFAs de cadeia muito longa com mais de 24 carbonos (Monroig *et al.*, 2012; 2017). No Crustáceo *Daphnia magna* são encontrados quatro elongases denominadas de ELOVL3/6, ELOVL1/7, ELOVL4 e ELOVL8 com base em relações filogenéticas com as elongases de mamíferos. As elongases ELOVL3/6 e ELOVL1/7 sintetizam SFAs de até 22 carbonos, para a ELOVL4 não foi possível identificar o tipo de produto sintetizado e acredita-se que a ELOVL8 sintetize PUFAs (Yoon *et al.*, 2022). No nematoide *Caenorhabditis elegans* a elongase chamada de Elo-2 foi identificada como importante para o alongamento do ácido palmítico (C16:0) e síntese de PUFAs precursores de triglicerídeos e fosfolípidios. A perda da funcionalidade de Elo-2 causou alterações no tamanho corporal, sistema reprodutivo e no comportamento rítmico intestinal de *C. elegans* (Kniazeva *et al.*, 2003). Em insetos, como descrito no Capítulo 1, as elongases também estão envolvidas no alongamento de diferentes substratos e desempenham uma variedade de funções (Chertemps *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2015; Chertemps, 2007; Pei *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020; Hasan *et al.*, 2019).

A especificidade para diferentes substratos e, conseqüentemente, a diversas funções atribuídas as elongases podem ser originadas por vários fatores, incluindo duplicações gênicas (Hashimoto *et al.*, 2008). O processo pelo qual genes duplicados geram novas funções ainda é muito discutido. Entende-se que após a duplicação, quatro processos podem ocorrer: ambos os parálogos podem conservar a mesma função, pode ocorrer um processo de subfuncionalização entre eles, um dos parálogos pode adquirir nova função (neofuncionalização) e um dos parálogos pode se tornar inativo, transformando-se em um pseudogene (Ohno, 1970, Lynch e Force, 2000) (Figura 15).

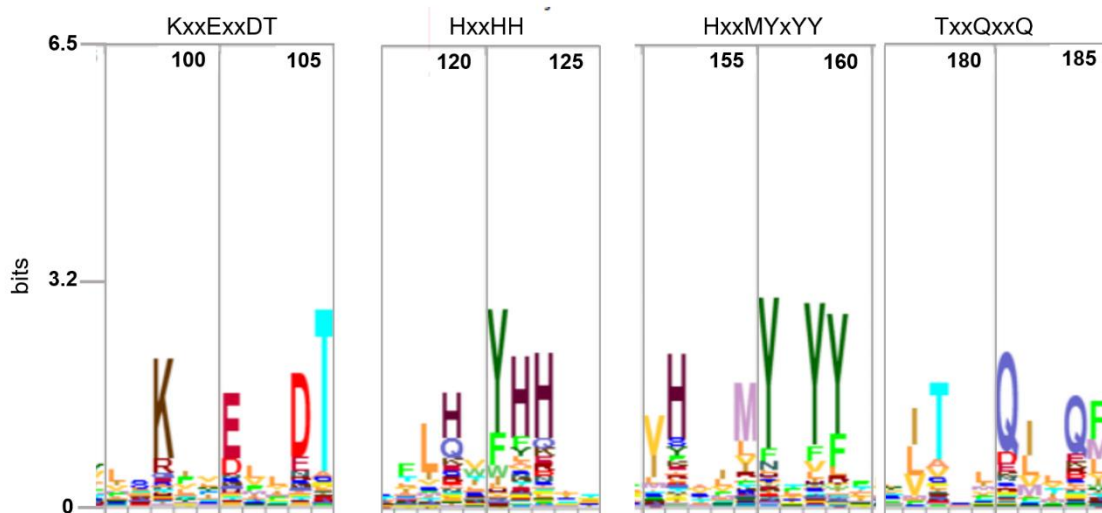


**Figura 15. Esquema representativo de possíveis destinos evolutivos dos genes originados após evento de duplicação gênica.** Cada barra representa um gene. Após sofrer duplicação, os genes parálogos formados que não sofrem mutações se tornam conservados (barra azul). No processo de formação de um pseudogene, este se torna inativo (barra cinza). No processo de neofuncionalização, uma das cópias do gene duplicado desenvolve uma nova função (barra laranja) e no processo de subfuncionalização, cada cópia do gene duplicado perde uma subfunção através de mutações degenerativas (metade cinza da barra), ficando apenas com uma parte da função do gene ancestral (metade azul da barra). Fonte: adaptado de Moharana, 2020.

Apesar de haver especificidade para distintos substratos entre as diferentes elongases, essas proteínas possuem *motifs* bem conservados ao longo da evolução. Os *motifs*, KxxExxDT, HxxHH, HxxMYxYY e TxxQxxQ são muito utilizados para a identificação e caracterização das elongases de diferentes organismos (Leonard *et al.*, 2004, Jakobsson *et al.*, 2006) (Figura 16). No entanto, um estudo que realizou mutações em resíduos de aminoácidos específicos de uma elongase da ameba *Dictyostelium discoideum*, mostrou que nem todos os resíduos presentes nesses *motifs* são importantes para a atividade da enzima. Por exemplo, para o *motif* HxxHH apenas os dois últimos resíduos de histidina são essenciais para a atividade de alongamento: quando o primeiro resíduo de histidina é trocado por alanina, a atividade enzimática permanece no mesmo nível da enzima selvagem (Hernandez-Buquer e Blacklock, 2013). Subsequentemente, foi constatado que as duas últimas histidinas do *motif* HxxHH fazem parte do sítio catalítico da elongase (Nie *et al.* 2021). Além disso, o estudo em ameba mostrou que a maioria dos resíduos conservados estão presumidamente voltados para o citosol da membrana do retículo endoplasmático (Figura 17). As autoras sugerem que alguns desses resíduos, como a treonina (T) pertencentes ao *motif* TxxQxxQ seja necessário para a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima, pois os

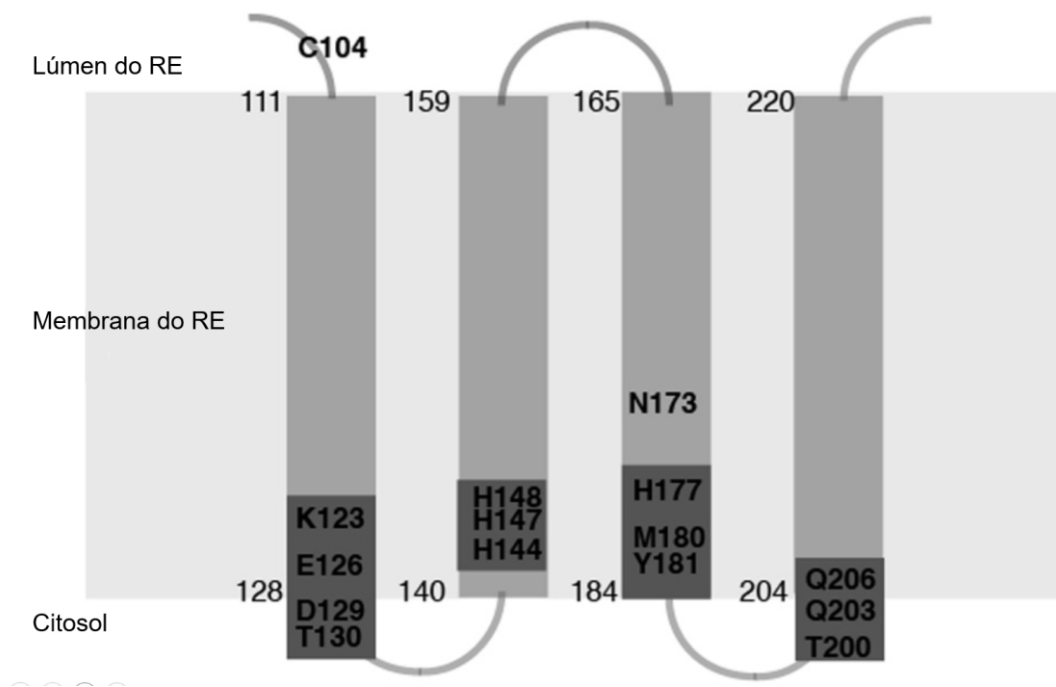
dois substratos (acil-CoA e malonil-CoA) estão localizados deste lado da membrana. A mutação desse resíduo reduziu em mais de 70% a atividade da elongase estudada, confirmando sua importância (Hernandez-Buquer e Blacklock, 2013). Essa hipótese foi sustentada novamente pelo estudo de Nie e colaboradores (2021) com ELOVL7 de humano, que mostrou que além desse resíduo de treonina, o primeiro resíduo de glutamina (Q) do *motif* TxxQxxQ, o resíduo de metionina (M) e o último resíduo de tirosina (Y) do *motif* HxxMYxYY são essenciais para a ligação específica da porção CoA dos substratos no sítio ativo da elongase. Já os resíduos de glutamina do *motif* TxxQxxQ e o resíduo de histidina de HxxMYxYY atuam na descarboxilação do malonil-CoA.

Outros resíduos, que não fazem parte dos quatro *motifs* mencionados, foram apontados como importantes para a atividade de alongamento. Um desses resíduos é uma asparagina (N) que também parece auxiliar no processo de descarboxilação do malonil-CoA (Nie *et al.*, 2021) e o outro é um resíduo de lisina (K) presente em uma das hélices transmembrana da enzima e que se encontra localizada próxima a extremidade do lúmen do Retículo endoplasmático. O comprimento dos AGs alongados é determinado pela distância entre o sítio ativo da elongase, que está voltado para o citosol celular, e este resíduo de lisina (Denic e Weissman, 2007).



**Figura 16. Logo HMM dos quatro *motifs* conservados nas sequências das elongases.** Estão representados trechos entre os resíduos 96 e 185 do logo HMM contido no PFAM, modelo que contém ao todo 242 resíduos. Cada letra corresponde ao símbolo dos aminoácidos presente na sequência do *motif* elongase produzido a partir de uma semente com 138 sequências. Em uma mesma posição de resíduo a altura de cada símbolo é proporcional à sua frequência de ocorrência. Os números na parte superior indicam a posição do último resíduo de cada caixa cinza. Fonte: adaptado de PFAM (<http://pfam-legacy.xfam.org/family/PF01151>), 2023.





**Figura 17. Representação esquemática do local predito para os resíduos de aminoácidos conservados na elongase de *D. discoideum*.** Os resíduos de aminoácidos conservados estão localizados na região das hélices transmembrana próximas ao citosol celular. A caixa grande em cinza claro representa a membrana do Retículo Endoplasmático (RE), os retângulos em cinza médio representam da terceira a sexta hélices transmembrana das sete previstas e os retângulos em cinza escuro, os *motifs* conservados. Os números que acompanham os símbolos dos resíduos indicam a posição de cada resíduo na sequência da elongase. Fonte: adaptado de Hernandez-Buquer e Blacklock, 2013.

Uma outra característica das elongases que pode estar relacionada com a sua funcionalidade é o número de domínios  $\alpha$ -hélice transmembrana que pode variar entre parálogos (Zheng *et al.*, 2017).

Com base nas particularidades das elongases, análises filogenéticas podem indicar se elongases que apresentam características semelhantes, como o tipo de substrato (SFAs, MUFAs e PUFAs), o tipo de função biológica e o número de domínios transmembrana se agrupam em um mesmo clado.

### 3.2. OBJETIVOS GERAIS

Analisar as elongases de diferentes insetos dentro da filogenia de Ophistokonta e buscar relações entre atividade enzimática, funções biológicas e número de domínios transmembrana dentro da árvore filogenética obtida.

### 3.2.1. Objetivos específicos

- 1) Definir parâmetros de *motifs* ou resíduos específicos que definam as elongases;
- 2) Obter sequências curadas de elongases de espécies do grupo Ophistokonta;
- 3) Gerar uma árvore filogenética com as sequências das elongases curadas;
- 4) Analisar a distribuição das elongases de insetos nos clados obtidos;
- 5) Analisar a existência de relações filogenéticas entre elongases que possuem especificidade para mesmo substrato, que exercem a mesma função biológica ou que possuem a mesma quantidade de domínios transmembranar.

### 3.3. METODOLOGIA

#### 3.3.1. Seleção das espécies para a construção da árvore filogenética

Selecionamos 18 espécies, dentro de Ophistokonta, pertencentes a diferentes táxons para a construção da árvore filogenética. Um critério determinante foi que todas possuem genoma sequenciado e são bem estudadas. As seguintes espécies foram selecionadas: os fungos *Saccharomyces cerevisiae* (Ascomycota) e *Amanita muscaria* (Basidiomycota), a esponja *Amphimedon queenslandica* (Porifera), a anêmona do mar *Actinia tenebrosa* (Cnidaria), o polvo *Octopus vulgaris* (Mollusca), o verme *Caenorhabditis elegans* (Nematoda), o carrapato *Ixodes scapularis* (Chelicerata), a lacraia *Strigamia maritima* (Myriapoda), a pulga d'água *Daphnia magna* (Crustacea), os hexápodos-não insetos *Orchesella cincta* (Entognatha) e *Folsomia candida* (Entognatha), os insetos *Locusta migratoria* (Orthoptera), *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera), *Tribolium castaneum* (Coleoptera), *Drosophila melanogaster* (Diptera), o peixe *Danio rerio* (Cypriniformes) e os mamíferos *Mus musculus* (Rodentia) e *Homo sapiens* (Primates). Como grupo externo foi escolhido o musgo *Physcomitrium (Physcomitrella) patens* (Bryopsida) (décima nona espécie).

### 3.3.2. Obtenção das sequências de elongases

Foi necessário definir quatro *motifs* para a busca de elongases que fossem cataliticamente ativas, sem considerar pseudogenes ou fragmentos gênicos: HH, [K]ou[R]xxxxx[D]ou[E], [N]ou[T]xxxH, [Y]ou[F]x[Y]ou[V]ou[I]ou[L]ou[F][Y]ou[V]ou[I]ou[L]ou[F]. Estes *motifs* foram definidos com base em quatro regiões conservadas descritas na literatura (Leonard *et al.*, 2004, Jakobsson *et al.*, 2006) e na análise experimental dos resíduos de aminoácidos que são essenciais para a atividade catalítica da elongase da ameba *D. discoideum* (Hernandez-Buquer e Blacklock, 2013).

Foi realizada uma busca para todas as sequências de elongases disponíveis no banco de dados do Uniprot em outubro de 2021 utilizando como filtro o nome: "elongation of very long chain fatty acids protein". No total, foram localizadas 20.169 sequências. Com o intuito de verificar se essas sequências eram de fato elongases, foi gerado e executado um *script* (Anexo I) para seleção de sequências que possuíam os quatro *motifs* definidos. Após a utilização do *script* foram filtradas positivamente 13.035 sequências que continham todos os quatro *motifs*. Em seguida foram selecionadas as sequências das elongases das 19 espécies de interesse e, como resultado, 469 sequências foram obtidas.

A obtenção das sequências no Uniprot e a execução do *script* foram realizadas em colaboração com o Prof. Thiago Motta Venâncio e o Dr. Francisnei Pedrosa, ambos do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), UENF.

### 3.3.3. Análise das sequências das elongases das espécies selecionadas

A fim de remover inconformidades nas 469 sequências obtidas, realizamos uma minuciosa análise das sequências com base nas características das elongases, como os *mostifs* conservados e as predições de domínios transmembrana. As sequências alinhadas foram analisadas no programa Bioedit e foram removidas algumas inconformidades encontradas, como repetições e sequencias incompletas. Ao todo foram excluídas 173 sequências e por fim, 293 sequências de elongases foram utilizadas para a construção da árvore filogenética.

### **3.3.4. Construção da árvore filogenética**

As 293 sequências foram alinhadas no programa MUSCLE e posteriormente a árvore foi gerada no programa MEGA utilizando o método de Máxima Verossimilhança. O melhor modelo evolutivo escolhido para o conjunto de dados foi LG+I+G4. O suporte dos ramos foi estimado usando 1000 aproximações do método ultrafast bootstrap. Essa árvore foi construída em colaboração com o Dr. Francisnei Pedrosa e o Prof. Thiago Motta Venâncio (LQFPP, UENF).

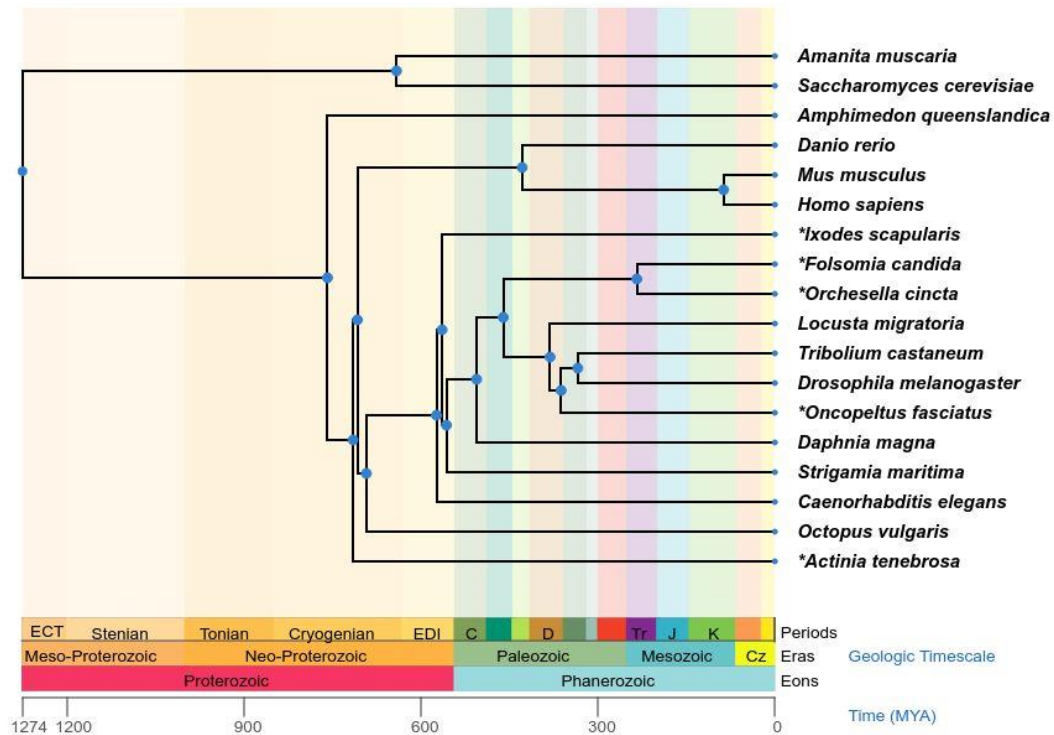
### **3.3.5. Análise do número de domínios transmembranar das elongases**

Os domínios  $\alpha$ -hélice transmembranar predito para cada uma das 293 elongase das 19 espécies foram obtidos no DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) em agosto de 2023.

## **3.4. RESULTADOS**

### **3.4.1. Distribuição evolutiva das espécies utilizadas para a construção da filogenia das elongases**

As relações filogenéticas das 18 espécies do grupo Ophistokonta utilizadas para a construção da árvore das elongase encontra se na Figura 18.



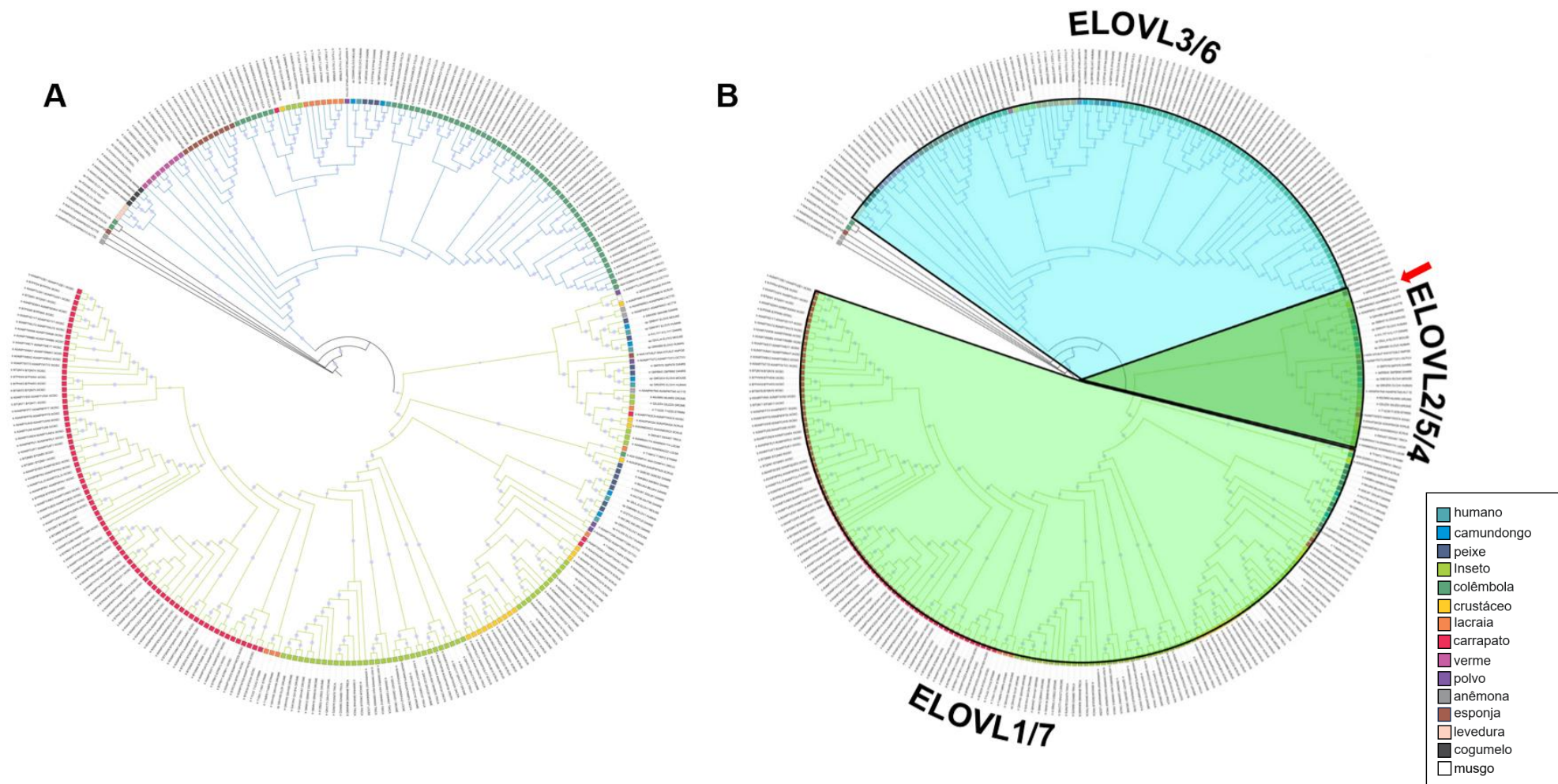
**Figura 18. Relações e distância evolutiva das espécies estudadas.** Estão presentes as 18 espécies dentro de Ophistokonta que foram utilizadas para a construção da árvore filogenética das elongases. A espécie que serviu como grupo externo, o musgo *Physcomitrium* (*Physcomitrella*) *patens* não está presente. A distância evolutiva entre *P. patens* e o grupo monofilético Ophistokonta é de 1,6 bilhões de anos (dado não mostrado). Os períodos, eras e éons são indicados na parte inferior da figura. Dados obtidos em <http://timetree.org/> em agosto de 2023. Os asteriscos (\*) significam espécies que não foram encontradas na árvore guia do TimeTree e por isso foram substituídas por outra espécie equivalente para a construção da árvore.

### 3.4.2. Filogenia das elongases

Do total de 293 sequências das elongases, 288 se agrupam em dois grandes grupos parafiléticos (Figuras 19A). Aparte desses dois grandes grupos, cinco elongases ficaram localizadas na base da árvore: duas de *Actinia tenebrosa* (Cnidaria), uma de *Amphimedon queenslandica* (Porifera) e duas de *Folsomia candida* (Entognatha).

Para uma melhor compreensão, essa árvore será apresentada tendo como referência a filogenia de mamíferos, representada pelas espécies *Mus musculus* e *Homo sapiens*. Dessa forma, as elongases se distribuem em três clados: ELOVL3/6, ELOVL2/5/4 e ELOVL1/7 (Figura 19B). Em um dos grandes grupos parafiléticos encontra-se o clado ELOVL3/6, e no outro grupo estão os clados ELOVL2/5/4 e ELOVL1/7. A elongase do musgo *P. patens* se agrupou dentro do clado ELOVL2/5/4. Isso, junto com o fato de que foram recuperados

dois grupos parafiléticos não permite a inferência de quais seqüências seriam ancestrais.



**Figura 19. Árvore filogenética das elongases de 18 organismos do grupo Ophistokonta. (A)** Os clados parafiléticos diferenciam-se pelas cores azul e verde dos ramos. **(B)** Divisão da árvore nos clados ELOVL3/6, ELOVL2/5/4 e ELOVL1/7, com base nas elongases de mamíferos. A elongase do grupo externo (musgo *P. patens*) encontra-se no clado ELOVL2/5/4, indicado pela seta vermelha.



### 3.4.3. Distribuição das elongases de insetos e outros artrópodes na árvore filogenética

A descrição do número de parálogos de elongases por espécies e em cada clados está disposta na Tabela 2. O clado ELOVL1/7 possui 157 parálogos, seguido do clado ELOVL3/6 que apresenta 105 parálogos. O clado ELOVL2/5/4 pode ser subdividido no subclado ELOVL2/5, que apresenta apenas 10 parálogos e no subclado ELOVL4, que possui 15 parálogos.

No clado ELOVL3/6 ocorre uma expansão de elongases nos Entognatha (colêmbolos) *O. cincta* e *F. candida* que possuem 27 e 32 parálogos, respectivamente (Figura 20, Tabela 2). O percevejo, besouro e mosca possuem um gene cada nesse clado e, curiosamente, o gafanhoto não possui elongase no clado 3/6.

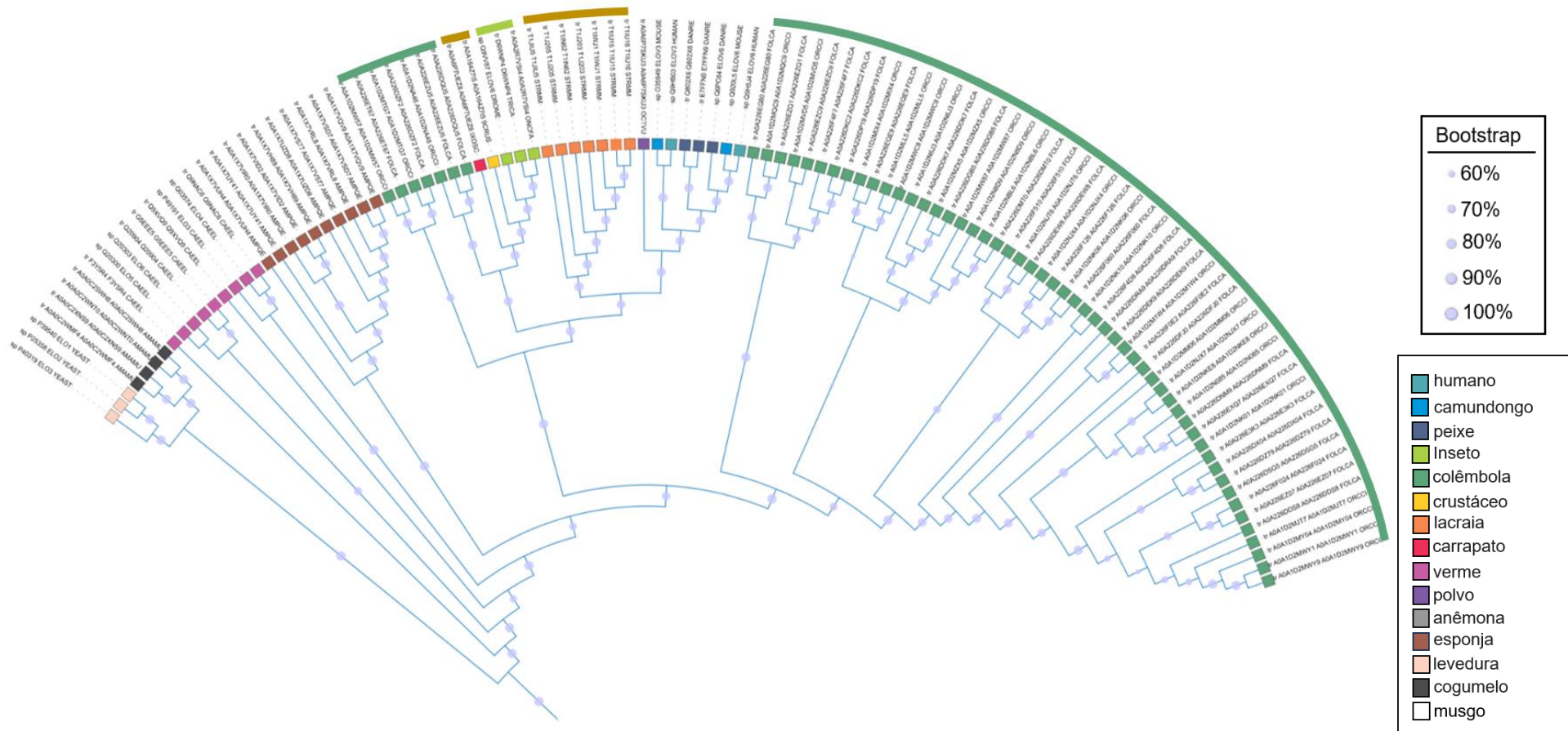
O subclado ELOVL2/5 não possui genes de artrópodes, com a única exceção de um gene do crustáceo *D. magna*. No subclado ELOVL4 quase todos os artrópodes possuem elongases, com exceção dos dois colêmbolos e do percevejo.

No clado ELOVL1/7 encontra-se a maioria das elongases dos artrópodes e ocorre uma grande expansão no carrapato *I. scapularis*, que possui 79 parálogos (Figura 21). Com relação aos insetos, todos apresentam expansão no número de parálogos no clado ELOVL1/7, sendo essa expansão menor no gafanhoto e percevejo (5 e 6 parálogos) e maior nos dois holometábolos, o besouro e mosca, que possuem 16 e 18 parálogos, respectivamente (Figura 21, Tabela 2).

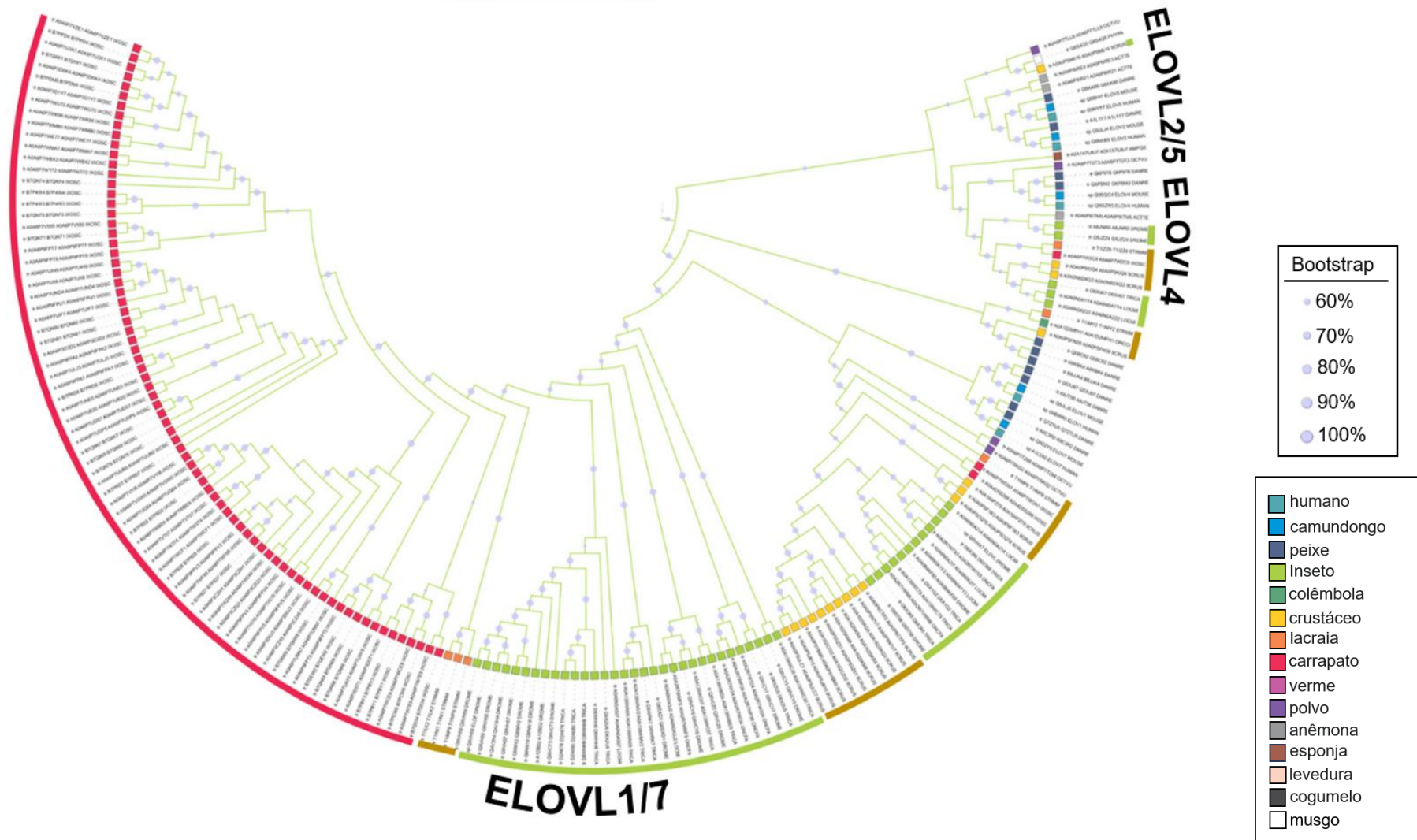


**Tabela 2.** Número de elongases das 19 espécies utilizadas para a construção da árvore filogenética separadas no clado ELOVL3/6, subclados ELOVL2/5 e ELOVL4 e clado ELOVL1/7. Em cinza o musco *P. patens* utilizado como grupo externo

Espécies	Número de elongases					Total por espécie
	Base da árvore	Clados				
		ELOVL3/6	ELOVL2/5	ELOVL4	ELOVL1/7	
musgo ( <i>P. patens</i> )	-	-	1	-	-	<b>1</b>
cogumelo ( <i>A. muscara</i> )	-	4	-	-	-	<b>4</b>
levedura ( <i>S. cerevisiae</i> )	-	3	-	-	-	<b>3</b>
esponja ( <i>A. queenslandica</i> )	1	10	-	1	-	<b>12</b>
anêmona ( <i>A. tenebrosa</i> )	2	-	2	1	-	<b>5</b>
polvo ( <i>O. vulgaris</i> )	-	1	1	1	2	<b>5</b>
verme ( <i>C. elegans</i> )	-	9	-	-	-	<b>9</b>
carrapato ( <i>I. scapularis</i> )	-	1	-	1	79	<b>81</b>
lacraria ( <i>S. maritima</i> )	-	7	-	1	5	<b>13</b>
crustáceo ( <i>D. magna</i> )	-	1	1	2	14	<b>18</b>
colêmbola ( <i>O. cincta</i> )	-	27	-	-	1	<b>28</b>
colêmbola ( <i>F. candida</i> )	2	32	-	-	-	<b>34</b>
gafanhoto ( <i>L. migratoria</i> )	-	-	-	2	5	<b>7</b>
percevejo ( <i>O. fasciatus</i> )	-	1	-	-	6	<b>7</b>
besouro ( <i>T. castaneum</i> )	-	1	-	1	16	<b>18</b>
mosca ( <i>D. melanogaster</i> )	-	1	-	1	18	<b>20</b>
peixe ( <i>D. rerio</i> )	-	3	2	2	7	<b>14</b>
camundongo ( <i>M. musculus</i> )	-	2	2	1	2	<b>7</b>
humano ( <i>H. sapiens</i> )	-	2	2	1	2	<b>7</b>
<b>Total por grupo</b>	<b>5</b>	<b>105</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>157</b>	<b>293</b>



**Figura 20. Distribuição das elongases no clado ELOVL3/6 da árvore filogenética.** As linhas curvas externas à árvore destacam as elongases de artrópodos. A linha em verde escuro indica a expansão de parálogos dos colêmbolas *Folsomia candida* e *Orchesella cincta*, linha em verde claro indica os insetos e linhas em marrom o restante dos artrópodos (Crustacea, Myriapoda e Chelicerata). As esferas (●) entre os ramos indicam os valores de bootstrap.



**Figura 21. Distribuição das elongases nos subclados ELOVL2/5 e ELOVL4 e no clado ELOVL1/7 da árvore filogenética.** As linhas curvas externas à árvore destacam as elongases de artrópodos. A linha em vermelho indica a expansão dos parálogos do do Chelicerata *Ixodes scapularis*, linhas em verde claro indicam os insetos e linhas em marrom indicam Crustacea e Myriapoda. As esferas (●) entre os ramos indicam os valores de bootstrap.

#### 3.4.4. Número de domínios transmembranar

Identificamos uma pequena variação no número de domínios transmembranares (TMs) entre sequências de elongases de algumas espécies, com maior predominância para elongases com sete domínios TMs (Tabela 3). Das 293 sequências de elongases analisadas, em 273 foi predito sete domínios TMs, apenas uma sequência de *O. fasciatus*, uma de *S. marítima* e uma de *D. magna* apresentou, respectivamente, três, nove e 12 domínios transmembranar e seis sequências de diferentes espécies apresentaram cinco ou seis domínios TMs.

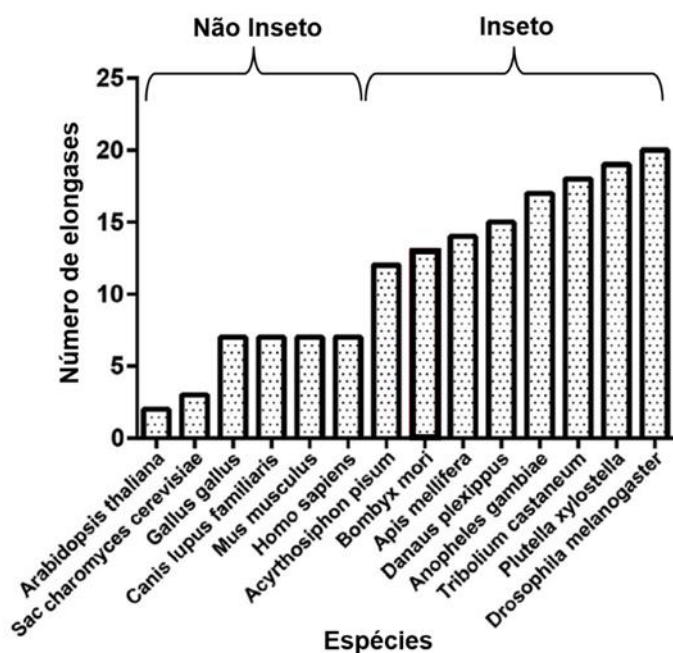
**Tabela 3.** Número de domínios transmembranar das elongases das 19 espécies utilizadas para a construção da árvore filogenética. Em cinza o musgo *P. patens* utilizado como grupo externo

Espécies	Número de domínios transmembranar					
	3	5	6	7	9	12
musgo ( <i>P. patens</i> )	-	-	-	1	-	-
cogumelo ( <i>A. muscara</i> )	-	-	-	4	-	-
levedura ( <i>S. cerevisiae</i> )	-	-	-	3	-	-
esponja ( <i>A. queenslandica</i> )	-	1	-	11	-	-
anêmona ( <i>A. tenebrosa</i> )	-	-	-	5	-	-
polvo ( <i>O. vulgaris</i> )	-	-	-	5	-	-
verme ( <i>C. elegans</i> )	-	-	-	9	-	-
carrapato ( <i>I. scapularis</i> )	-	1	1	79	-	-
lacrãia ( <i>S. marítima</i> )	-	-	2	10	1	-
crustáceo ( <i>D. magna</i> )	-	2	-	15	-	1
colembola ( <i>O. cincta</i> )	-	-	-	28	-	-
colembola ( <i>F. candida</i> )	-	1	2	31	-	-
gafanhoto ( <i>L. migratória</i> )	-	-	1	6	-	-
percevejo ( <i>O. fasciatus</i> )	1	1	-	5	-	-
besouro ( <i>T. castaneum</i> )	-	-	-	18	-	-
mosca ( <i>D. melanogaster</i> )	-	-	-	20	-	-
peixe ( <i>D. rerio</i> )	-	-	-	14	-	-
camundongo ( <i>M. musculus</i> )	-	-	-	7	-	-
humano ( <i>H. sapiens</i> )	-	-	-	7	-	-
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>278</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

### 3.5. DISCUSSÃO

Outros trabalhos também utilizam a filogenia de mamíferos como referência para entender a distribuição e as relações filogenéticas das elongases de insetos e outros Artrópodes (Zuo *et al.*, 2018; Yoon *et al.*, 2022). Além disso, no trabalho de

por Zuo e colaboradores (2018), a expansão de elongases em insetos também foi observada: diferentes insetos possuem número de elongases variando entre 12 e 20 para as oito espécies amostradas, sendo seis destas distintas das analisadas aqui. Estas quantidades de elongase são sempre maiores quando comparadas com planta, fungo e vertebrados (Figura 22). Os autores também identificaram que a expansão de elongases desses insetos ocorre no clado ELOVL1/7, por exemplo, das 13 elongases de *Bombyx mori* identificadas, 11 pertencem a esse clado, corroborando os dados aqui encontrados com outras espécies. Em *Tenebrio molitor* também foi mostrado que as elongases desse besouro ocorrem principalmente no clado ELOVL1/7 (Zheng *et al.*, 2017). Nesses dois trabalhos não foi identificado nenhuma elongase de inseto no subclado ELOVL2/5, corroborando com os nossos resultados.



**Figura 22. Número de elongases em diferentes espécies de organismos.** Planta (*Arabidopsis thaliana*), levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), galo (*Gallus gallus*), cachorro (*Canis lupus familiaris*), camundongo (*Mus musculus*), humano (*Homo sapiens*), pulgão (*Acyrtosiphon pisum*), bicho da seda (*Bombyx mori*), abelha (*Apis mellifera*), borboleta (*Danaus plexippus*), mosquito (*Anopheles gambiae*), **besouro (*Tribolium castaneum*)**, traça (*Plutella xylostella*) e mosca (***Drosophila melanogaster***). As espécies em negrito também foram analisadas no presente trabalho. Fonte: adaptado de Zuo *et al.*, 2018.

Quanto as elongases que possuem descrição, no clado ELOVL3/6 apenas a elongase *Noa* de *D. melanogaster* foi funcionalmente caracterizada, sintetizando SFAs de 18 carbonos e atuando em processos reprodutivos e patológicos e na morfologia mitocondrial (Jung *et al.*, 2007; Senyilmaz *et al.*, 2015; Palu e Chow,

2018). Outras enzimas nesse clado sintetizam SFAs e MUFAs com diferentes tamanhos de cadeia e funções biológicas: ELO1, ELO2 e ELO3 de *S. cerevisiae*, por exemplo, sintetizam SFAs de 16, 24 e 26 carbonos, respectivamente (Toke e Martin, 1996; Oh *et al.*, 1997; Paul *et al.*, 2006). Já a ELOVL3 de camundongos sintetiza SFAs e MUFAs de 24 carbonos que compõe o tecido adiposo marrom importante na proteção contra o frio (Westerberg *et al.*, 2006) e a ELOVL6 de camundongo que sintetiza SFAs e MUFAs de 12 e 14 carbonos (Bond *et al.*, 2016).

Já no subclado ELOVL4 apenas Elo68 $\alpha$  de *D. melanogaster* foi caracterizada, sendo importante para a síntese de MUFAs de 16 e 18 carbonos e atuando em órgãos reprodutores masculinos (Chertemps *et al.*, 2005). A ELOVL4 de mamíferos, por sua vez, sintetiza SFAs e PUFAs importantes para a correta estruturação de células fotorreceptoras da retina e impermeabilização da pele, impedindo a desidratação cutânea (Zhang *et al.*, 2001; Vasireddy *et al.*, 2007).

O clado ELOVL1/7 é o que mais possui elongases com diferentes características. A descrição funcional está disponível para as elongases dELOVL, Bond, Sit e EloF de *D. melanogaster* que atuam em diferentes funções como descrito no Capítulo 1 (Gordon *et al.*, 2018; Szafer-Glusman *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2015; Danielsen *et al.*, 2016; Combs *et al.*, 2018; Lin *et al.* 2018). A elongase ELOVL4 de *Tribolium castaneum* e a LmELO7 de *Locusta migratória* são ambas importantes na impermeabilização cuticular, protegendo o organismo contra a perda de água (Vargas, 2019; Zhao *et al.*, 2020) enquanto a ELOVL2 de *T. castaneum* é essencial para a eclosão do ovo deste besouro, como será discutido no Capítulo 3. A ELOVL1 de mamíferos é importante para a mielinização dos neurônios (Isokawa *et al.*, 2019) e a ELOVL7 que está associada ao câncer de próstata (Tamura *et al.*, 2009). Em *T. molitor* a elongase TmELO1 atua na síntese de SFAs de 24 carbonos, enquanto TmELO2 sintetiza SFAs e MUFAs de 16 carbonos (Zheng *et al.*, 2017).

Com relação ao número de domínios TMs, elongases com diferentes números de domínios estão presentes em todos os quatro clados da árvore filogenética.

Com base nos dados acima, observamos que não há um agrupamento específico entre elongases com características semelhantes, tanto dentro dos insetos quanto entre insetos e outros Ophisthokontas. Foi feita uma tentativa de se inferir a função de elongases de *B. mori* baseado nas funções de outras elongases previamente caracterizadas que se agrupavam no mesmo clado (Zuo *et al.*, 2018)



mas, conforme descrito aqui, entendemos que isso pode induzir a interpretações errôneas sobre as funções exercidas pelas elongases.

A construção de uma nova árvore filogenética contendo outras espécies de insetos que possuem elongases com funções conhecidas, além de espécies de eucariotos basais está em andamento. Os resultados obtidos a partir dessa nova árvore serão avaliados para uma melhor compreensão das relações filogenéticas entre elongases.

### **3.6. CONCLUSÕES**

- 1) A filogenia das elongases de Ophistokonta apresenta dois grandes grupos parafiléticos;
- 2) Os insetos e outros artrópodes apresentam uma expansão de parálogos de elongases quando comparado com espécies pertencentes a outros táxons. Essa expansão não obedece nenhuma ordem filogenética;
- 3) Utilizando como referência a filogenia de mamíferos, a maioria das elongases de insetos pertence ao clado ELOVL1/7, enquanto o subclado ELOVL2/5 não possui nenhuma elongase de insetos;
- 4) O número de domínios  $\alpha$ -hélice transmembrana pode variar entre elongases, porém a maioria possui sete domínios;
- 5) Não ocorre agrupamento específico de elongases com características semelhantes na árvore filogenética.

#### **4. CAPÍTULO 3 – O gene *Tc-elovl2* é essencial para a eclosão da larva do besouro *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)**

Este capítulo descreve a investigação do papel do gene *Tc-elovl2*, que codifica uma elongase, no processo de eclosão das larvas do *Tribolium castaneum* a partir de análises fisiológicas, morfológicas e moleculares.



#### 4.1. INTRODUÇÃO

Nos insetos ovíparos, o momento da eclosão do ovo marca o começo do estágio de vida pós-embrionário. Dependendo do tipo de desenvolvimento que os pterigotos (insetos alados) apresentam, a fase que emerge do ovo pode ser uma ninfa, como é o caso dos insetos hemimetábolos ou uma larva, em insetos holometábolos (Chapman, 2013; Gullan e Cranston, 2021).

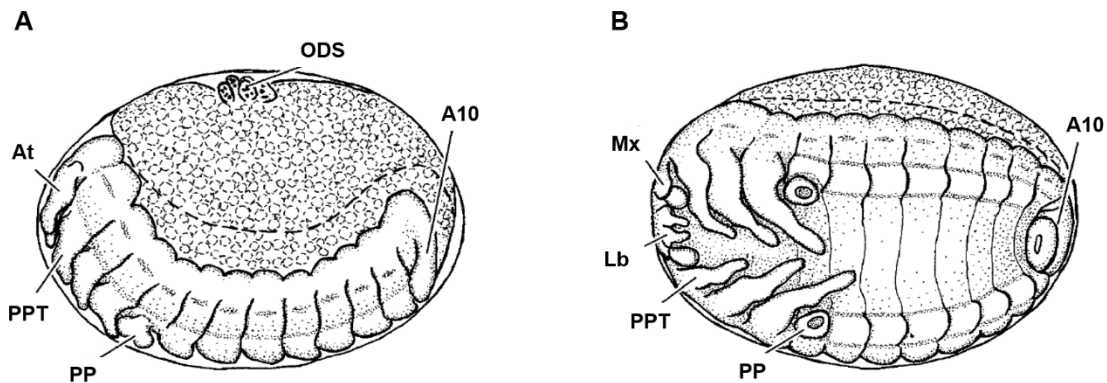
A emergência do primeiro estágio pós-embrionário do inseto de dentro do ovo pode parecer um evento simples, mas para eclodir os insetos precisam romper todas as camadas que compõem a casca do ovo e isso requer um conjunto de mecanismos fisiológicos, morfológicos e/ou comportamentais eficientes, que podem variar entre espécies (Perez de La Fuente *et al.*, 2019).

Alguns insetos, por exemplo, utilizam suas estruturas mandibulares para mastigar ou empurrar as membranas do ovo, como ocorre na mariposa *Sitotroga cerealella* e na mosca *Lucilia sericata*, respectivamente. Outros insetos possuem espinhos de eclosão, que são estruturas presentes em determinada parte do corpo, geralmente na cabeça, utilizados para romper a casca através de uma fenda, como os existentes na pulga *Ceratophyllus wickhami* e na cutícula embrionária do piolho *Polyplax serrata*. Existe também o processo de eclosão facilitado pela absorção do líquido amniótico e a entrada de ar no embrião, como o que acontece com o besouro *Tenebrio molitor*. Ao engolir o líquido amniótico, a larva do *T. molitor* fica mais robusta e alonga-se preenchendo o interior do ovo e ficando mais próximo a casca à medida que o ar preenche a traquéia do embrião, este se torna mais ativo e ao movimentar seu corpo, força a casca, rompendo-a. Neste besouro não existem espinhos de eclosão e a mandíbula não participa do processo de saída de dentro do ovo (Sikes e Wigglesworth, 1931; Wigglesworth, 1938; Yong *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2006).

Outro processo essencial para a eclosão que ocorre em alguns insetos e pode ocorrer em sinergia com os processos mecânicos descritos acima, é a digestão das camadas da casca do ovo através de ação enzimática (Slifer, 1937; Konopová, 2020). Na mosca *Lucilia cuprina* a atividade de serino e/ou metalo-proteases é essencial para a eclosão (Young *et al.*, 1999; 2000). Em muitos insetos que possuem cutícula serosa, a eclosão só é possível após a diminuição da espessura dessa cutícula, o que torna a casca do ovo mais frágil. Para isso, nos embriões da

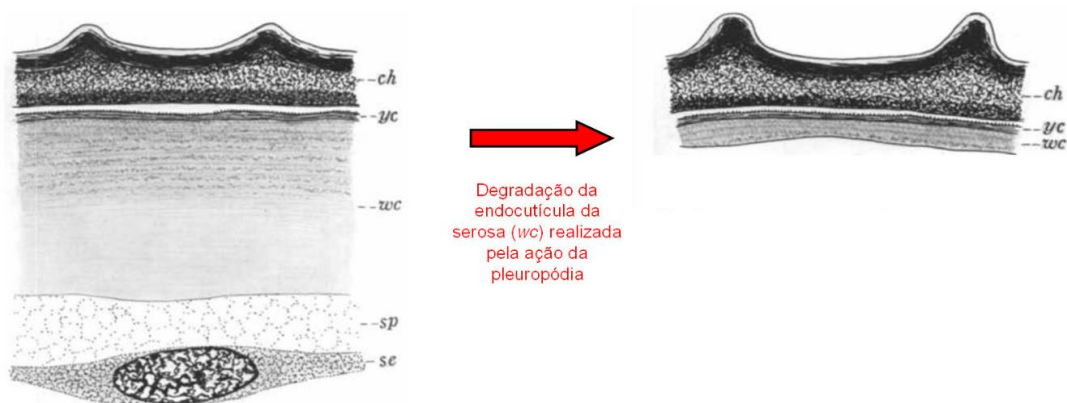
maioria das ordens de insetos ocorre a formação de um órgão glandular no primeiro segmento abdominal, chamado de pleuropódia (Figura 23).

Na Figura 23A pode-se verificar a presença da pleuropódia no primeiro segmento abdominal de um embrião de *Rhagophthalmus ohbai* (Coleoptera: Rhagophthalminae) dentro de um ovo a partir de em uma vista lateral. Na Figura 23B essa mesma estrutura é representada em uma vista ventral.



**Figura 23. Representação esquemática de um ovo de *Rhagophthalmus ohbai* (Coleoptera: Rhagophthalminae) com embrião de 18 dias de embriogênese. A embriogênese de *R. ohbai* dura cerca de 30-34 dias. (A) vista lateral e (B) vista ventral. Mx: maxila; Lb: lábio; PPT: perna protorácica; PP: pleuropódia; A10: décimo segmento abdominal; At: antena; ODS: órgão dorsal secundário. Fonte: adaptado de Kobayashi *et al.*, 2002.**

Segundo experimentos realizados em espécies de ortópteras e coleópteras, a pleuropódia secreta uma "enzima" ou, mais precisamente, um coquetel enzimático que digere a cutícula serosa para permitir a eclosão da larva (Slifer, 1937; 1938; Kobayashi *et al.*, 2003; Konopová *et al.*, 2020) (Figura 24).



**Figura 24. Representação esquemática da degradação da endocutícula que compõe a cutícula serosa em ovos de *Melanoplus differentialis* (Orthoptera: Acrididae) pela ação de enzimas secretadas pela pleuropódia. O esquema mostra as camadas da casca do ovo e a serosa de *M. differentialis* (à esquerda) e o que resta das camadas da casca do ovo após a ação das enzimas secretadas pela pleuropódia (à direita). Ch: córion, yc: epicutícula da cutícula serosa, wc: endocutícula da cutícula serosa, sp: espaço preenchido por líquido, sc: serosa. Fonte: adaptado de Slifer, 1937.**

## **4.2. OBJETIVO GERAL**

Investigar como o gene *Tc-elovl2* afeta a eclosão das larvas do besouro *T. castaneum*.

### **4.2.1. Objetivos específicos**

- 1) Verificar se a proteína predita para *Tc-elovl2* possui características de uma elongase
- 2) Determinar a expressão de *Tc-elovl2* durante a embriogênese;
- 3) Avaliar a taxa de eclosão dos ovos após o silenciamento de *Tc-elovl2* e duração do silenciamento em ovos de duas cepas;
- 4) Verificar o efeito do silenciamento de *Tc-elovl2* na morfologia das larvas ao final da embriogênese;
- 5) Avaliar o processo de eclosão das larvas após silenciamento de *Tc-elovl2*;
- 6) Avaliar o efeito do silenciamento de *Tc-elovl2* na estrutura da pleuropódia.

## **4.3. METODOLOGIA**

### **4.3.1. Análise da proteína predita para *Tc-elovl2***

Para avaliar se a proteína predita para *Tc-elovl2* (código do gene no iBeetleBase e no Ensembl Metazoa: TC034275) possui os resíduos de aminoácidos canônicos que são importantes para atividade catalítica das elongases, realizamos o alinhamento de Tc-ELOVL2 (código Uniprot: A0A139WC30) e das elongases ELOVL7 (Uniprot: A1L3X0) de *Homo sapiens*, Bond (Uniprot: Q9VCY7) de *Drosophila melanogaster*, ELO2 (Uniprot: YCR034W) de *Saccharomyces cerevisiae* e ELOVL10 (Uniprot: D6X467) de *Tribolium castaneum* no Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) com parâmetros padrão do programa em 11 de agosto de 2023. Também foi analisada a predição de domínios transmembranares para Tc-ELOVL2. Os domínios transmembranares foram preditos no DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) em 11 de agosto de 2023.

### **4.3.2. Manutenção da criação de *Tribolium castaneum***

Os indivíduos de *T. castaneum* utilizados nos experimentos são das cepas Geórgia GA-1, que possuem o genoma sequenciado e nGFP, que é uma cepa

transgênica que possui proteína verde fluorescente (GFP – do inglês *green fluorescent protein*) expressa no núcleo de todas as células (Sarrazin *et al.* 2012). A criação de *T. castaneum* é mantida no laboratório em estufa a 30 °C, pois nesta temperatura ocorre uma maior viabilidade das larvas (Bucher, 2009) e a 70-80% de umidade relativa (UR). Larvas e adultos permanecem em potes plásticos com farinha de trigo da marca Dona Benta, que serve como fonte de nutrientes. Antes de ser utilizada a farinha é esterilizada por um período de 24 horas à -70 °C seguido de 24 horas em estufa à 80 °C. Após esse período, a farinha é peneirada em uma malha de 300 µm e acondicionada em potes de vidro a 4 °C, sendo utilizada durante o prazo de validade determinado pelo fabricante. A cada duas semanas os adultos são separados dos imaturos e dos ovos produzidos utilizando-se peneira de solo com malha de 700 µm (Marca Betel, ISO 3310/1).

#### **4.3.3. Obtenção dos ovos de *Tribolium castaneum***

Adultos foram mantidos em farinha, onde fêmeas realizaram oviposição de forma constante. Após o período determinado para a postura, que variava de acordo com o experimento, os ovos foram separados dos adultos e da farinha utilizando peneiras de 700 e 250 µm de malha, respectivamente. Os ovos separados foram processados ou mantidos em estufa à 30 °C. Nesta temperatura, o desenvolvimento embrionário de *T. castaneum* ocorre em aproximadamente 86,4 horas (Bucher, 2009).

#### **4.3.4. Lavagem dos ovos de *Tribolium castaneum***

Antes dos experimentos, os ovos foram colocados em peneiras em malha de nylon e passaram por lavagens para a remoção da farinha de trigo que fica grudada na casca do ovo. Estas lavagens consistem em lavar os ovos por 3 minutos em água corrente, depois 3 minutos em água sanitária 100% (marca Qboa, 2% de cloro ativo) e em seguida mais 3 minutos em água corrente para a retirada de toda água sanitária.

#### **4.3.5. Expressão de *Tc-elov12* via RT-PCR**

Para a avaliação da expressão na embriogênese o RNA foi obtido de ovos de *T. castaneum* nos seguintes estágios do desenvolvimento embrionário: 0, 2, 6, 10, 12, 14, 24, 28, 48, 56 e 73 horas após a postura. Também foi extraído RNA de

ovários e da carcaça (corpo menos os ovários) de fêmeas adultas, utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen) de acordo com as normas do fabricante. A síntese de cDNA foi feita com o auxílio do Kit SuperScript III (Invitrogen) utilizando 0,4 µl de *random primers* e 0,6 µl de oligo-d(T)15. A técnica foi realizada seguindo as especificações do fabricante. A extração de RNA e síntese de cDNA de ovos em diferentes tempos da embriogênese foram realizados por Vargas (2015; 2019) e Xavier, (2018) e o material foi cedido pelos mesmos para a realização da RT-PCR.

Os primers utilizados foram: GGCAAACCTTATGCTGGTGGT (Forward) e TTTGACCGACTTTTGCTTCC (Reverse) para o gene *Tc-elovl2* e CAACTTGAGTGTGCTTGCCC (Forward) e GCTGGATTTTGGGTGCCTTG (Reverse) para o gene constitutivo de referência, *Tc-Rps6* (Vargas, 2019).

As PCRs foram realizadas utilizando o kit GoTaq Green Master Mix e o termociclador (Veriti well Thermal Cycler, 9902), a partir da seguinte programação: 1ª etapa à 95 °C por 3 minutos; 2ª etapa de 34 ciclos à 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos; 3ª etapa à 72 °C por 5 minutos; 4ª etapa à 4 °C por 5 minutos e 5ª etapa à 14 °C. Por fim, os fragmentos gênicos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corados com 3 µL de Brometo de Etídio.

#### **4.3.6. Silenciamento gênico via pRNAi**

O silenciamento de *Tc-elovl2* (*Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>*) foi executado de acordo com o protocolo descrito por van der Zee e colaboradores (2005), adaptado e desenvolvido por Vargas (2019). Pupas de ambas as cepas (GA-1 e nGFP) foram sexadas e cada sexo foi armazenado separadamente em potes plásticos com farinha esterilizada e mantidas em estufa a 30 °C e 70-80% de UR até se tornarem adultas. Moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) para *Tc-elovl2* foram produzidas a partir de um fragmento gênico de 463 nucleotídeos clonado em plasmídeo e confirmado por sequenciamento. Foi utilizado o kit MEGAscript® RNAi Kit (AM1626) para a síntese de dsRNA, conforme instruções do fabricante. Tanto a clonagem quanto a síntese de dsRNA foram realizadas previamente por Vargas (2015; 2019). O volume total de 207 nL de dsRNA foi injetado no abdômen de fêmeas adultas virgens, com cerca de uma semana de idade após a metamorfose do estágio de pupa, com o auxílio do nanoinjetor Nanoject II (Drummond Scientific, 3-000-206A). As dsRNA

foram injetadas na concentração de 125 ng/  $\mu$ L em cada fêmea, ou seja, foram injetados 25,9 ng de dsRNA por fêmea, a partir de três injeções consecutivas de 69 nL cada.

Utilizamos ovos selvagens (sem silenciamento) como controle para todos os experimentos com silenciamento de *Tc-elovl2*. Experimentos prévios foram realizados com o gene *Tc-verm* como controle, no qual o silenciamento desse gene não alterou a viabilidade dos ovos (Vargas 2019).

#### **4.3.7. Avaliação da taxa de eclosão dos ovos e do tempo de duração do silenciamento de *Tc-elovl2***

A taxa de eclosão dos ovos controle e silenciados para *Tc-elovl2* (*Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>*) e o tempo de duração do efeito do silenciamento foi avaliada nos seguintes dias após a injeção (DAI) de dsRNA: 3, 6, 7, 14, 17, 21 e 24 para ovos da cepa GA-1 e 2, 6, 7, 14, 17, 21 e 24 para ovos da cepa nGFP. Para isso, as fêmeas injetadas com dsRNA foram colocadas junto com machos em potes contendo farinha de trigo esterilizada para postura de ovos. Os ovos dos diferentes DAI foram coletados após 24 h de postura, colocados em placas de 96 poços e deixados em estufa a 30 °C e 70-80% de UR. Após quatro dias, a viabilidade dos ovos foi contabilizada para determinar a taxa de eclosão.

#### **4.3.8. Preparação de cutícula para avaliação da morfologia dos embriões**

Ovos controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* foram lavados e colocados em lâminas de vidro e sobre eles foi adicionado 30-50  $\mu$ L da solução de Hoyers pré-aquecido a 45 °C. Durante as lavagens, larvas dos ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* que não eclodiram ficaram sem a estrutura dos ovos. As amostras foram deixadas em estufa a 60 °C por 48 h para a digestão de todo conteúdo interno das larvas, com exceção do exoesqueleto, que resiste à solução de Hoyers. Em seguida a morfologia das larvas foi observada em microscopia de fluorescência no canal verde, através da sua cutícula externa, devido à autofluorescência apresentada pelo exoesqueleto larval.

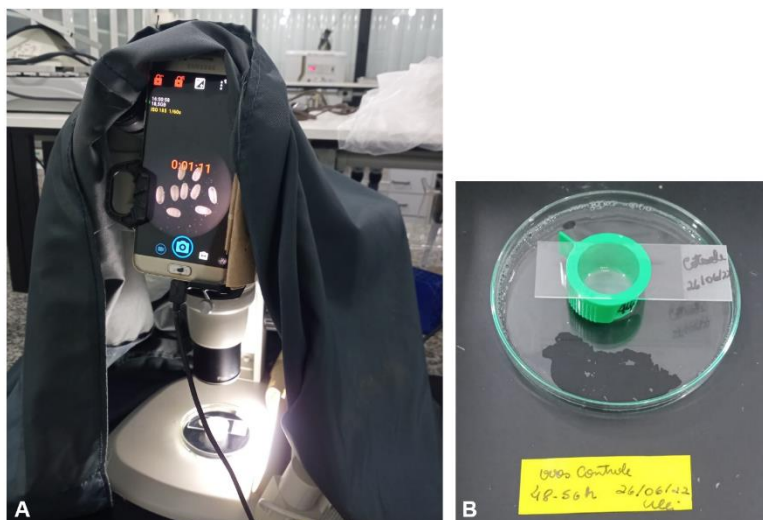
#### **4.3.9. Avaliação do processo de eclosão das larvas**

Para analisar o processo de eclosão das larvas, ovos controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* com idade de 48 a 56 horas de embriogênese foram lavados por 10 segundos em

água sanitária 50% e enxaguados por 2,5 minutos em água corrente. A lavagem neste experimento foi diferente da lavagem padrão como descrito no item 3.3. Isso foi necessário pois nesse experimento os ovos, após a lavagem, ficaram expostos por 24 horas a uma fonte de luz próxima e constante. Caso os ovos fossem lavados seguindo o protocolo padrão (item 3.3) eles ficavam desidratados e murchavam, tanto controle quanto silenciados, impedindo a obtenção dos resultados.

Após a lavagem, os ovos foram deixados na estufa por 24 horas e colocados em lâminas de vidro para observação na lupa estereoscópica (Nikon, C-PS) (Figura 25). As lâminas foram colocadas sobre uma mini peneira de nylon que, por sua vez, foi colocada dentro de uma placa de petri com água e detergente para evitar que formigas carregassem os ovos, como foi observado em um experimento prévio. Do lado da lupa e próximo aos ovos foi colocada uma luminária que foi deixada acesa durante todo o experimento para uma melhor visualização dos ovos. A capa da lupa foi utilizada para cobrir a lupa e a fonte de luz da luminária para evitar que a luz externa atrapalhasse a visualização dos ovos. Imagens dos ovos vistos pela lupa foram obtidas com a câmera traseira do celular Samsung (Galaxy S7 edge), programado para capturar imagens a cada 2 minutos por 24 horas, totalizando 720 fotos em cada experimento. O celular foi colocado em um adaptador (Celestron, CA 90503) que foi conectado a uma das lentes oculares da lupa (Figura 26A) e as imagens foram obtidas utilizando o aplicativo OpenCamera. As configurações da ferramenta ISO e Balanço de Branco foram alteradas no OpenCâmera para a obtenção de uma imagem com melhor resolução. Dois parâmetros foram contabilizados a partir dos horários de registro de cada imagem capturada: 1) a idade embrionária em que cada larva iniciou o processo de eclosão e 2) o tempo total que cada larva levou no processo de eclosão ou na tentativa de eclodir. Além disso, para alguns ovos foram criados vídeos do comportamento da larva no processo de eclosão. Os vídeos foram criados no site <https://ezgif.com/maker>. Foram realizados cinco experimentos independentes: dois apenas com ovos controle da cepa GA-1, dois com ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* da cepa GA-1 e um com ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* da Cepa nGFP. Nos experimentos com ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* para as duas cepas, ovos controle foram colocados em lâminas de vidro e deixados do lado da lupa para verificação da eclosão ao final dos experimentos (Figura 26B). Em cada

experimento foi utilizado entre 9 a 14 ovos para cada condição (controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>*).



**Figura 25. Sistema de aquisição de imagens digitais para registro do processo de eclosão de ovos. (A)** Celular fixado a um adaptador que se conecta a uma das lentes oculares da lupa para observação de imagens dos ovos que foram montados em lâminas e colocadas sobre uma mini peneira de nylon. Ao lado da lupa, uma luminária para uma melhor visualização dos ovos e por cima da luminária e da lupa, a capa da lupa para proteger o experimento contra a luz externa. **(B)** Ovos controle montados em lâminas e deixados em placa de petri com água e detergente.

#### **4.3.10. Avaliação da taxa de eclosão dos ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* desenvolvidos em 75 e 99,9% de umidade relativa**

Ovos controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* da cepa nGFP coletados após 24 horas de postura foram colocados em placas de 96 poços e mantidos 75% de UR e um outro conjunto de ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* foi colocado em um ambiente com 99,9% de UR. Todos os ovos permaneceram a 30 °C durante o experimento. Após quatro dias, a taxa de eclosão dos ovos foi contabilizada.

O ambiente de 99,9% de UR foi obtido com um pote de plástico vedado contendo água que cobria praticamente todo o seu interior. Dentro do pote com água foi colocada uma placa de 96 poços com os ovos e um termo-higrômetro (Amprobe, TR-200A) para medir a UR.

#### **4.3.11. Fixação dos ovos**

A fixação dos ovos foi realizada de acordo com van der Zee e colaboradores (2005) e adaptado por Vargas (2015), com as seguintes etapas: após lavagens em água sanitária e água corrente, ovos com faixas de idade entre 4-20 e 48-56 horas da embriogênese foram fixados em recipiente (*via*) de vidro contendo mistura de



PBS (solução salina tamponada com fosfato: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), com formaldeído 4% e heptano por 1 hora e meia. Posteriormente foi realizada substituição da fase aquosa (PBS e formaldeído) por metanol 100%, seguida de agitação do recipiente para a mistura das fases e remoção das cascas dos ovos de idade entre 4-20 horas. Os ovos foram lavados quatro vezes em metanol, transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e estocados a -20 °C até a realização de experimentos de hibridização *in situ*.

Os ovos com idade entre 48-56 horas após a fixação passaram por etapas adicionais para a remoção da casca conforme descrito por Panfilio e colaboradores (2013). Isso foi necessário pois ovos nessa idade possuem uma cutícula serosa espessa que se associa a membrana vitelina do ovo e isso impede a casca do ovo de se romper. Ovos com casca são impermeáveis a sonda e por isso não podem ser utilizados para a hibridização *in situ*. Dessa forma, ovos com casca que permaneceram no *vial* após a fixação foram colados em uma fita dupla face que foi fixada a uma placa de petri contendo PBS. Em seguida, os ovos tiveram suas cascas removidas manualmente utilizando uma pinça e uma agulha hipodérmica de 8 mm. Após a remoção da casca, os ovos foram colocados novamente no *vial* contendo a mistura de PBS e formaldeído e foram fixados por 20 minutos. Após a fixação, os ovos passaram por duas lavagens com PBT (PBS 1x e Tween-20 a 0,1%) e em seguida foram transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5 mL com metanol e estocados a -20 °C até a realização de experimentos de hibridização *in situ*.

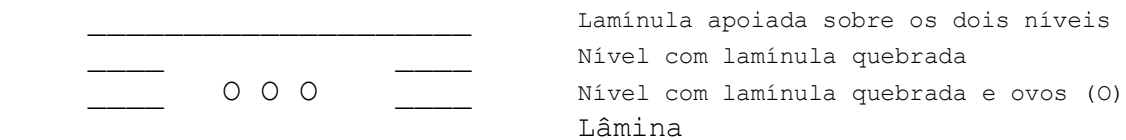
#### **4.3.12. Hibridização *in situ***

A hibridização *in situ* foi realizada de acordo com Nunes da Fonseca e colaboradores (2008), com adaptações feitas por Panfilio e colaboradores (2014) e contribuições pessoais de Gustavo Rezende (Anexo II). Ovos fixados foram enxaguados a 30% de PBT em metanol, depois a 70% de PBT em metanol e a 100% PBT. Em seguida, passaram por 3 lavagens com PBT por 5 minutos cada para garantir a remoção de todo o metanol. Depois das lavagens, o PBT foi removido e os ovos foram incubados por 10 minutos em solução 50% PBT com 50% Hyb Solution I (50% Formamida, 5x SSC, 50 µg/mL Heparina, com pH 5,5. Ao final deste período, os ovos foram incubados por 10 minutos em 100 % Hyb Solution I.

Todas as etapas até aqui foram realizadas à temperatura ambiente em agitador orbital. Posteriormente, a Hyb Solution I foi removida e os ovos foram incubados em Hyb Solution II (Hyb Sol I com 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão) por 1 hora a 55 °C em banho seco com agitação de 200 RPM (Thermo Shaker, MS-100). A mistura foi substituída por 100 µL da mesma solução, acrescida de 0,3 a 1,8 µL da sonda de RNA, previamente aquecida a 85 °C por 3 minutos e resfriada até 55 °C no termociclador. O material permaneceu com a sonda de RNA *overnight* em banho seco com agitação. Após essa etapa foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos cada com Hyb Solution I, mais 4 lavagens de 30 minutos cada com Hyb Solution I, uma lavagem de 10 minutos em solução 2:1 (2 Hyb Sol I: 1 PBT) e uma lavagem de 10 minutos em solução 1:2 (1 Hyb Sol I: 2 PBT). Todas essas lavagens foram realizadas à 55 °C em banho seco com agitação. Em seguida, os ovos foram lavados 4 vezes por 10 minutos cada em PBT à temperatura ambiente em agitador orbital. Em seguida, os ovos passaram por 2 lavagens de 30 minutos cada em solução de bloqueio (275 uL Western blocking reagent (WBS) + 725 uL PBT / 1 mL). Novamente os ovos foram incubados *overnight* em 1 mL de solução de bloqueio com o anticorpo anti-DIG-AP (diluído 5.000 vezes) à 4 °C no agitador orbital. Após essa incubação, a solução foi removida e os ovos foram lavados 3 vezes com PBT por 5 minutos cada e depois mais 3 vezes com BPT por 15 minutos à temperatura ambiente. O PBT foi substituído por Tampão Alcalino (100mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0,2% Tween-20) e neste tampão os ovos passaram por mais duas lavagens de 5 minutos cada.

Para a visualização colorimétrica, ovos foram incubados no Tampão Alcalino contendo a solução de marcação com NBT/BCIP. As amostras na solução foram transferidas para um vidro relógio e mantidas no escuro enquanto a coloração se desenvolvia. Após o aparecimento do padrão específico de coloração, o que pode geralmente variar entre 20 minutos e 3 horas (ainda que em alguns casos esse tempo pode chegar até a 24 horas), o processo foi interrompido com 6 lavagens com PBT por 5 minutos cada, seguidas de lavagens em 50% e 75% de etanol em PBT por 5 minutos e depois em 100% etanol por até 10 minutos. Logo depois, os ovos passaram por lavagens com etanol 50% e 25% em PBT para reidratação. Os ovos foram lavados mais 3 vezes com PBT por 5 minutos e por fim, o PBT foi removido e os ovos foram colocados em 50% Vectashield com DAPI em PBS 1x e mantidos à 4

°C até a visualização no microscópio com DIC e dos núcleos marcados com DAPI no canal de UV. Para a visualização no microscópio, lâminas foram montadas com o material da *in situ* e sobre eles foi adicionado 15 µL de Vectashield 100%. Para a montagem da lâmina ovos foram colocadas no espaço entre duas lamínulas cortadas pela metade e sobrepostas para servirem de espaçadores para apoiar a lamínula que recobriria a amostra, conforme esquema abaixo (Figura 26):



**Figura 26.** Esquema representativo da montagem dos ovos em lâmina de vidro com dois espaçadores para a visualização no microscópio.

Essa estrutura possibilitava a movimentação dos ovos na lâmina e visualização dos embriões em diferentes posições.

A hibridização *in situ* foi realizada como a sonda antisense de *Tc-elovl2* em ovos com idades entre 4-20 e 48-56 horas de embriogênese. Utilizamos a sonda senso de *Tc-elovl2* como controle negativo e as sondas antisense dos genes *Tc-zen1* e *Tc-G7* como controles positivos. O gene *Tc-zen1* foi escolhido pois apresenta marcação exclusiva na serosa (Falciani *et al.*, 1996) enquanto *Tc-G7* apresenta diferentes marcações conforme a idade embrionária (Rezende, dados não publicados).

#### 4.3.13. Análise da pleuropódia

Sabendo que a pleuropódia é um órgão transitório, primeiramente fizemos uma análise deste órgão em embriões com diferentes idades para determinar o melhor momento para a comparação da pleuropódia de ovos controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>*. Nesse experimento foram utilizados ovos apenas da cepa nGFP, em que todas as células possuem núcleos que expressam GFP. Para essa análise inicial, escolhemos embriões entre 48-56, 60-62, 70-72 e 84-86 horas da embriogênese. Para cada um desses estágios os ovos foram lavados e colocados em lâminas de vidro e sobre os ovos foi adicionado óleo de amendoim (Hain Pure Foods, Hain Food Group) para a visualização no microscópio de fluorescência. Para que pudéssemos mover os ovos na lâmina e visualizar a pleuropódia em diferentes posições, as

lâminas também foram montadas como mencionado no item 3.12 (Figura 27) . Os embriões com idades entre 48-56 h da embriogênese foram considerados como os melhores para as análises da pleuropódia, pois ela se apresenta bem formada e o embrião ainda não se move nesse estágio embrionário, o que ocorrerá em estágios mais tardios (Koelzer, 2014).

A análise comparativa da pleuropódia de embriões controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* foi realizada através de microscopia convencional de fluorescência (microscópio ZEISS, Axio Imager.A2 ) que fica no Laboratório de Ciências Ambientais da UENF e microscopia confocal de fluorescência (microscópio ZEISS, LSM 710) que fica no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF. No microscópio confocal utilizamos a ferramenta Z-stacks, que realiza o escaneamento da amostra em fatias permitindo a obtenção da imagem em vários planos focais. A espessura dos cortes realizados no Z-stacks foi de 1 µm, o comprimento de onda do laser utilizado foi de 488 nm e a intensidade do laser de 7,5%. As imagens obtidas no microscópio confocal foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Ana Eliza Zeraik

#### **4.3.14. Análise estatística**

Para avaliar se existem diferenças significativas nas taxas de eclosão entre os diferentes dias após a injeção em ovos silenciados da mesma cepa foi realizado a Análise de Variância (One-way ANOVA) seguida de teste de Tukey, com grau de significância de 0,05. Entre ovos controle e silenciados em um mesmo dia após a injeção foi realizado o teste t de Student, com grau de significância de 0,05. O teste t de Student também foi utilizado para analisar se existem diferenças significativas entre o tempo que as larvas controle, silenciadas que eclodiram e silenciadas que não eclodiram iniciaram o processo de eclosão e realizam ou tentaram realizar o processo de eclosão. A One way ANOVA foi realizada utilizando o programa Past, versão 4.03 e o teste t de Student foi realizado no programa Jamovi, versão 2.3.28.

### **4.4. RESULTADOS**

#### **4.4.1. A proteína predita para *Tc-elovl2* é uma elongase canônica**

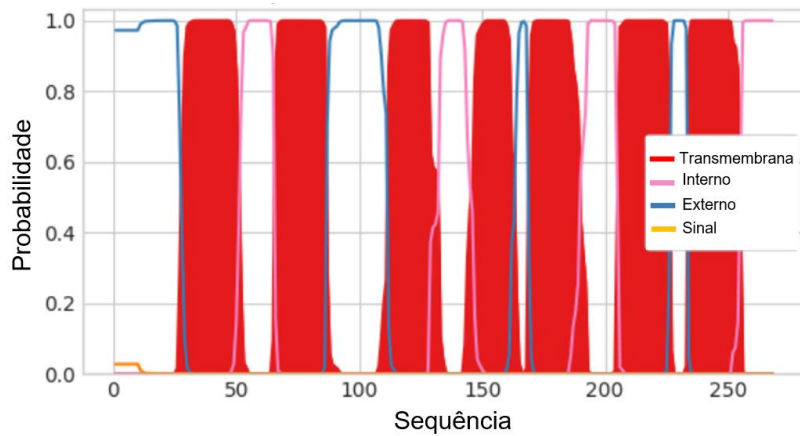
A comparação da sequência da proteína predita para *Tc-elovl2* com outras elongases conhecidas mostra que Tc-ELOVL2 apresenta os resíduos conservados

que são importantes para a atividade catalítica das elongases (Hernandez-Buquer e Blacklock, 2013) (Figura 27).

Scer (ELO2)	--MNSLVTQYAAPLFERYPQLHDYLP LTERPFFNISLWEHFDDVVTRV TNGRFVPSSEFQF	58
Tcas (ELOVL10)	--MVNLIN---STQTTLTKIYDY-----YEWTL SLSDSR-----T	30
Dmel (bond)	--MTNYIK---IV-----EER-----ISGLSKGVDET-----V	23
Tcas (ELOVL2)	--MVGLVR---MAF-----DRY-----HTILDRI SDPR-----T	24
Hsap (ELOVL7)	MAFSDLTS---RTV-----HLY-----D-NWIKDADPR-----V	25
	: . : :	
Scer (ELO2)	IAGELPLSTLPPVLYAITAYYVIIFGGRFLLSKSKPFKLNGLFQLHNLVLTSLSLTLLLL	118
Tcas (ELOVL10)	KGWPLVDSPGPTLLYTLIYLF-IVWIGPKLMKNRKFRLTWLLIPYNLTMAVLNAYIA--	87
Dmel (Bond)	DSWFLMSSPMPVAVVVLVYLAFLVKIGPEYMKNRKFMDLKRIMVFYNAFQVLYSIWMC--	81
Tcas (ELOVL2)	SDWPLMQSPVPTIMMVVYLYVILILGPRFMANRKFELREVLIAYNGAQVLYSLFML--	82
Hsap (ELOVL7)	EDWLLMSSPLPQTILLGFVYVFTSLGPKMLNKRPFELKKAMITYNFFIVLFSVYMC--	83
	* * * : * : : * : : * : : . . :	
Scer (ELO2)	MVEQLVPIIVQHGLYFAICNIGAWTQ----PLVTLYMNYIVKPIEFIDTFVFLVKHK-	172
Tcas (ELOVL10)	-IQLLTASTRLR--YSYICEPCRQRYHPDELQIANAVWVYFSLLEFCDTFFFLRKKD	144
Dmel (Bond)	-RTSIQESNMVASIFSKKCEINR--TREQNLTLYSGAWFYFSSKIDLDLDTFFVLRKKD	138
Tcas (ELOVL2)	-YEHLMSGWFWD--YSFKCQPVYDYSNNKALRMANLCWVYISKLTFEADTFVFLRKKD	139
Hsap (ELOVL7)	-YEFVMSGWIG--YSFRCDIVDYSRSPALRMARTCWLYYFSKPIELDTIFFVLRKKD	140
	: : * : *	
Scer (ELO2)	-KLTFLHTYHHGATALLCYTQLM-GTTSISWVPI SINGVHVMYWYFLAARGIR----	226
Tcas (ELOVL10)	RQLTFLHYVHHSMTMFLWNIKIVPSGSTFLPAMVSAIHVLMYAYYGLAALGPHIARY	204
Dmel (Bond)	NQVSLFHVYHHTITVLFVSWGYLKYAPGEGVIGIILNSGVHIMYFYMVAAMGPQYQKY	198
Tcas (ELOVL2)	SQVTLHLHYHHSLTPLETWLVKFLAGGHGTFNSLNNMVMHIMYFYMVAAMGPYQKY	199
Hsap (ELOVL7)	SQVTLHFVHHTIMPWTWVGVKFAAGGLGTFHALINTAVHVMYSYGLSALGPAYQKY	200
	::: * * : *	
Scer (ELO2)	VWVKEWVTRFQIDQFVLDIGFIYAVYQKAVHLYFPIPHCGDCVGSSTTATFAGCAISS	286
Tcas (ELOVL10)	LWVKKYITFDQMTDFTCALILGING-IRTGCDPFLWM-----HYTLIIYMLS	250
Dmel (Bond)	LWVKKYMTSFDQVFLILGYMLTV-GAKGCNMPKTL-----TFFVFGNTVI	244
Tcas (ELOVL2)	LWVKKHITFDQVGLVFIHSAQLLF-TDCGYPRFI-----GALLLHSAI	245
Hsap (ELOVL7)	LWVKKYITFDQVQVIVAIHISQFFMEDCKYQFPVF-----ACIIMSYSFM	248
	: * * : *	
Scer (ELO2)	YLVLFISFYINVYKRKGTKTSRVVKRAHGVAAKVNEYVNVDL--KNVTPSPSP----	339
Tcas (ELOVL10)	FIVLFGNFYKAYMEKGSQVFFGMD---MCGGQNTYQRITNH-----HQNGKKI--	297
Dmel (Bond)	FLYLFGNFYRKYKAKSVDDGSR---TGSSLAQSALRAAGMGCMPTMNAKGKHLLQ	300
Tcas (ELOVL2)	FFALFTHFYQTYSRKQKSVKAE-----	268
Hsap (ELOVL7)	FLLLFLHFWRAYTKGQRLPKTVKN---GTCKNKDN-----	281
	:: * * * : : . . .	
Scer (ELO2)	-----KPQHRKR	347
Tcas (ELOVL10)	-----D-----	298
Dmel (Bond)	NGQVGKAYIDLNNNSVKPMKLE--	322
Tcas (ELOVL2)	-----	268
Hsap (ELOVL7)	-----	281

**Figura 27. Alinhamento de elongases de fungo, insetos e humano.** Resíduos de aminoácidos essenciais para atividade catalítica das elongase são indicados em vermelho. Os símbolos abaixo do alinhamento indicam resíduos idênticos (\*), altamente conservados (:), e conservados (.). Scer: *Saccharomyces cerevisiae*, Tcas: *Tribolium castaneum*, Dmel: *Drosophila melanogaster*, Hsap: *Homo sapiens*.

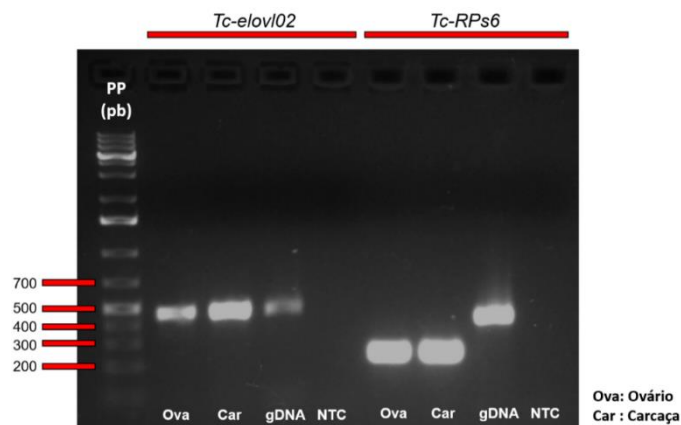
Podemos destacar as duas últimas histidinas (H) pertencentes ao *motif* HxxHH, o resíduo de asparagina (N) que provavelmente auxilia no processo de descarboxilação do malonil-CoA, um dos substratos das elongases, entre outros. Além disso, a análise do perfil transmembrana de Tc-ELOVL2 indica a presença de sete domínios transmembrana para a proteína predita (Figura 28), que também são preditas para a maioria das elongases e que foi recentemente confirmado via cristalografia de Raio-X para ELOVL7 de humano (Nie *et al.*, 2021).



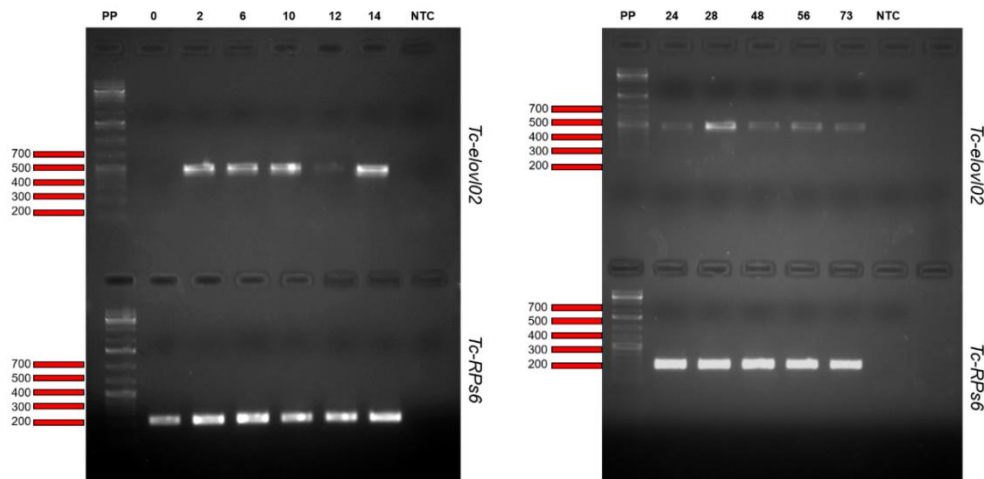
**Figura 28. Predição de hélices transmembranaras para Tc-ELOVL2.** Sete domínios transmembranaras para Tc-ELOVL2 são preditos pelo programa DeepTMHMM. Linhas vermelhas preenchidas indicam domínios transmembranaras, linhas em rosa e azul indicam as probabilidades das regiões serem voltadas para a parte interna e externa da bicamada lipídica, respectivamente. Linha laranja indica a probabilidade de existência de peptídeo sinal (que no caso não há).

#### 4.4.2. expressão de *Tc-elovl2* em *Tribolium castaneum* ocorre tanto em fêmeas adultas quanto em ovos postos

Através do RT-PCR foi detectada a expressão de *Tc-elovl2* no ovário e no resto do corpo da fêmea adulta (Figura 29). Também foi confirmada a expressão até 48 horas de embriogênese, como descrito por Vargas (2015) e observada a expressão, pela primeira vez, em tempos mais tardios (56 e 73 horas) (Figura 30). O controle com DNA genômico pra PCR de *Tc-elovl2* apresentou uma banda de tamanho menor que o esperado, diferente de experimentos prévios (Vargas 2019).



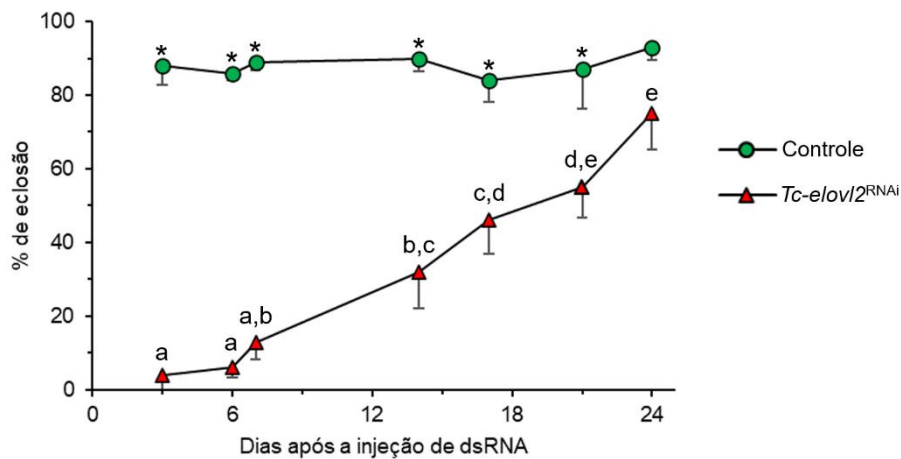
**Figura 29. Expressão gênica de *Tc-elovl2* em ovário e carcaça de fêmea de *Tribolium castaneum*.** Amplificações utilizando cDNAs de ovário e carcaça, DNA genômico (gDNA) e *no template control* (NTC) para os genes *Tc-elovl2* e *Tc-Rps6* (gene constitutivo). O tamanho de banda esperado para o cDNA de *Tc-elovl2* e de *Tc-Rps6* é de 463 e 224 pares de bases, respectivamente. Para o DNA genômico o tamanho esperado é de 7.727 pb para *Tc-elovl2* e 410 pb para *Tc-Rps6*. PP: padrão de peso.



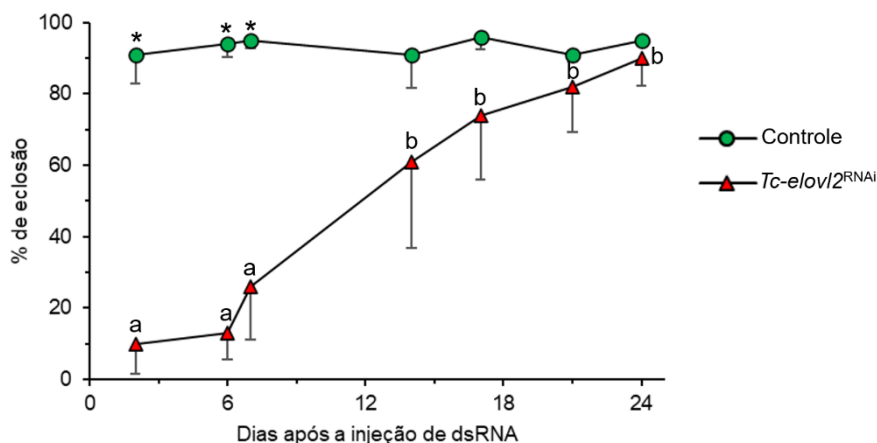
**Figura 30. Expressão gênica de *Tc-elovl2* ao longo da embriogênese de *Tribolium castaneum*.** Amplificações com cDNAs obtidos a partir de embriões de 0, 2, 6, 10, 12, 14 (painel à esquerda), 24, 28, 48, 56 e 73 (painel à direita) horas da embriogênese ) e *no template control* (NTC) para os genes *Tc-elovl2* e *Tc-Rps6* (gene constitutivo). O tamanho de banda esperado para o cDNA de *Tc-elovl2* e de *Tc-Rps6* é de 463 e 224 pares de base, respectivamente. PP: padrão de peso.

#### 4.4.3. O silenciamento diminui a eclosão dos ovos das duas cepas estudadas

O silenciamento de *Tc-elovl2* diminui drasticamente a eclosão dos ovos de *T. castaneum* para a cepa GA-1, quando comparado com ovos controle (Figura 31), conforme descrito previamente (Vargas, 2019). Esse efeito é prolongado, tendo seu ponto médio em aproximadamente 17 dias após a injeção (DAI) da dupla fita de RNA (dsRNA) e com diferença significativa em relação à ovos controle com até 21 DAI. Já na cepa nGFP o efeito letal dura menos tempo, com seu ponto médio sendo com aproximadamente 11 DAI e com diferença significativa em relação à ovos controles com até 7 DAI (Figura 32).



**Figura 31. Taxa de eclosão dos ovos e duração do silenciamento para *Tc-elovl2* na cepa GA-1.** As taxas de eclosão dos ovos controle e ovos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> foram avaliadas nos dias 3, 6, 7, 14, 17, 21 e 24 após a injeção da dupla fita em fêmeas adultas. Cada ponto representa média e desvio padrão de três experimentos independentes com um total de 1713 ovos controle e 1273 ovos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> analisados. Letras distintas (a, b, c, d, e) significam diferenças significativas na taxa de eclosão dos ovos silenciados entre os diferentes dias após a injeção da dupla fita (ANOVA e teste Tukey,  $P < 0,05$ ). Asterisco (\*) significa diferença significativa na taxa de eclosão entre ovos controle e silenciados em um mesmo dia (teste t de Student,  $P < 0,05$ ).



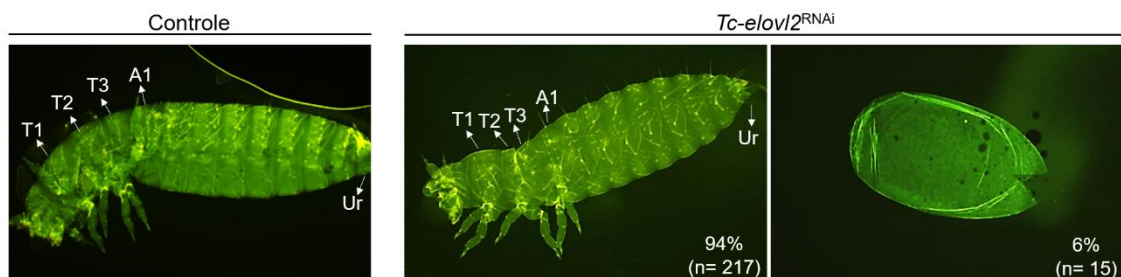
**Figura 32. Taxa de eclosão dos ovos e duração do silenciamento para *Tc-elovl2* na cepa nGFP.** As taxas de eclosão dos ovos controle e ovos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> foram avaliadas nos dias 2, 6, 7, 14, 17, 21 e 24 após a injeção da dupla fita em fêmeas adultas. Cada ponto representa média e desvio padrão de três experimentos independentes com um total de 1851 ovos controle e 1152 *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> analisados. Letras distintas (a, b) significam diferenças significativas na taxa de eclosão dos ovos silenciados entre os diferentes dias após a injeção da dupla fita (ANOVA e teste Tukey,  $P < 0,05$ ). Asterisco (\*) significa diferença significativa na taxa de eclosão entre ovos controle e silenciados em um mesmo dia (teste t de Student,  $P < 0,05$ ).

#### 4.4.4. O silenciamento de *Tc-elovl2* não afeta a morfologia das larvas ao final da embriogênese

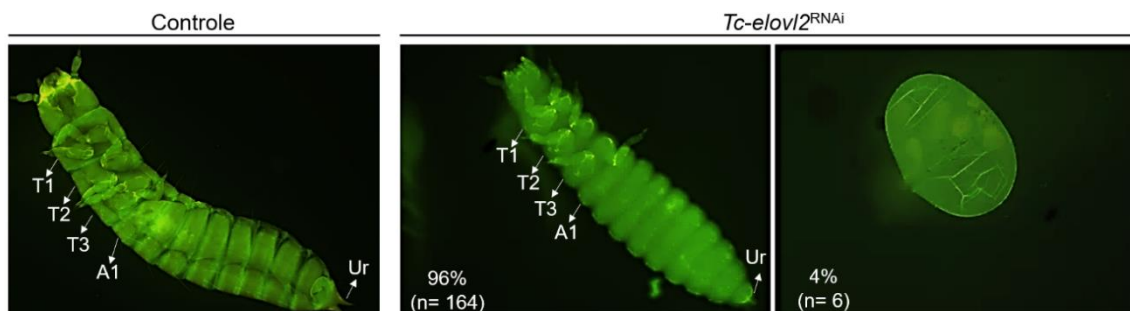
Visto que o silenciamento de *Tc-elovl2* afeta a eclosão dos ovos, mas os embriões se desenvolvem normalmente no início da embriogênese (Vargas, 2015),



passamos a analisar a morfologia das larvas no final da embriogênese. Para isso, utilizamos ovos que não eclodiram (cerca de 80-90%, na primeira semana de silenciamento), realizamos a preparação de cutícula e observamos a morfologia externa das larvas não eclodidas em microscopia de fluorescência. O desenvolvimento embrionário ocorre normalmente nos ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* nas duas cepas estudadas, ou seja, as larvas são formadas corretamente. Na cepa GA-1, 94% dos ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* apresentaram larvas com cabeça, apêndices e segmentos torácicos e abdominais iguais às do controle e os outros 6% consistiam em ovos vazios (Figura 33). Na cepa nGFP, 96% dos ovos eram larvas completamente formadas e os 4% restante eram ovos vazios (Figura 34).



**Figura 33. Morfologia das larvas G1-A ao final da embriogênese nas condições controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>*.** Microscopia de fluorescência foi realizada com preparações de cutícula, que emitem autofluorescência no canal verde. Dos 232 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* analisados, 217 (94%) eram larvas completamente formadas. T1, T2, T3, respectivamente: três segmentos torácicos, A1: primeiro segmento abdominal, Ur: urugomphi.



**Figura 34. Morfologia das larvas nGFP ao final da embriogênese nas condições controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>*.** Microscopia de fluorescência foi realizada com preparações de cutícula, que emitem autofluorescência no canal verde. Dos 170 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* analisados, 164 (96%) eram larvas completamente formadas. T1, T2, T3, respectivamente: três segmentos torácicos, A1: primeiro segmento abdominal, Ur: urugomphi. Os outros 4% eram ovos vazios.

#### 4.4.5. O silenciamento de *Tc-elovl2* impede as larvas de completarem o processo de eclosão

Para avaliar se as larvas após o silenciamento seguiam sendo viáveis, analisamos comparativamente o comportamento das larvas controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* durante o processo de eclosão (Figura 35).

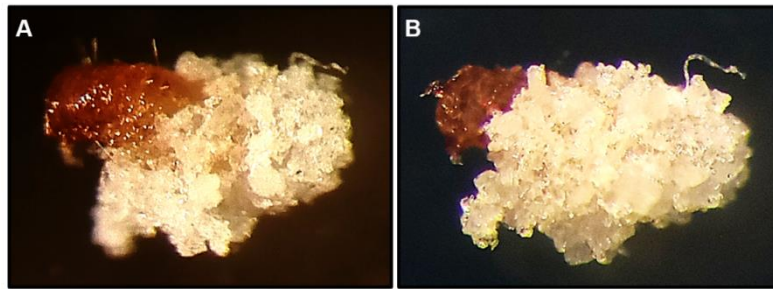
As imagens sequenciais obtidas mostram que as larvas GA-1 da condição controle quando estavam prontas para eclodir (Figura 35A) se movimentavam ativamente (Figura 35B) e durante esses movimentos conseguiam romper a casca do ovo abrindo uma fenda (Figura 35C). Em seguida começavam a sair de dentro do ovo através da região dorsal do corpo, próximo a cabeça (Figura 35D) e posteriormente saíam por completo a partir de movimentos lentos (Figura 35E). Já as larvas GA-1 *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* que não eclodiram realizam os mesmos movimentos que as controle, tentando sair de dentro do ovo (Figuras 35F-H), porém não conseguiam romper a casca. Por fim, essas larvas apresentavam aparência de desidratadas e murchavam diminuindo de tamanho ainda dentro do ovo (Figura 35I e J). Este comportamento ocorreu com todas as larvas GA-1 que não eclodiram. Note que enquanto todo o processo de eclosão na larva controle leva 28 minutos (Figura 35A-E) a tentativa de eclosão da larva silenciada leva 68 minutos (Figura 35F-H).

Por outro lado, as larvas nGFP *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* que não eclodiram apresentam dois comportamentos (Figura 35K-T). Dos quatro ovos analisados, dois apresentaram comportamento semelhante ao da cepa GA-1, no qual as larvas se movimentavam tentando romper a casca do ovo e por não conseguir murchavam dentro do ovo (Figura 35K-O). Os outros dois apresentaram um comportamento intermediário: as larvas realizavam movimentos para sair de dentro do ovo (Figura 35P, Q), conseguiam romper a casca, uma parte do corpo saía de dentro do ovo (Figura 35R), mas depois a larva murchava com a parte do corpo que conseguiu sair para fora da casca (Figura 35S, T). Note que os processos registrados para as duas larvas nGFP perfazem cerca de 4 horas. Em alguns experimentos houve algumas poucas larvas *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* de ambas as cepas que eclodiram (dados não mostrados). Estas apresentaram o mesmo comportamento que as larvas controle.



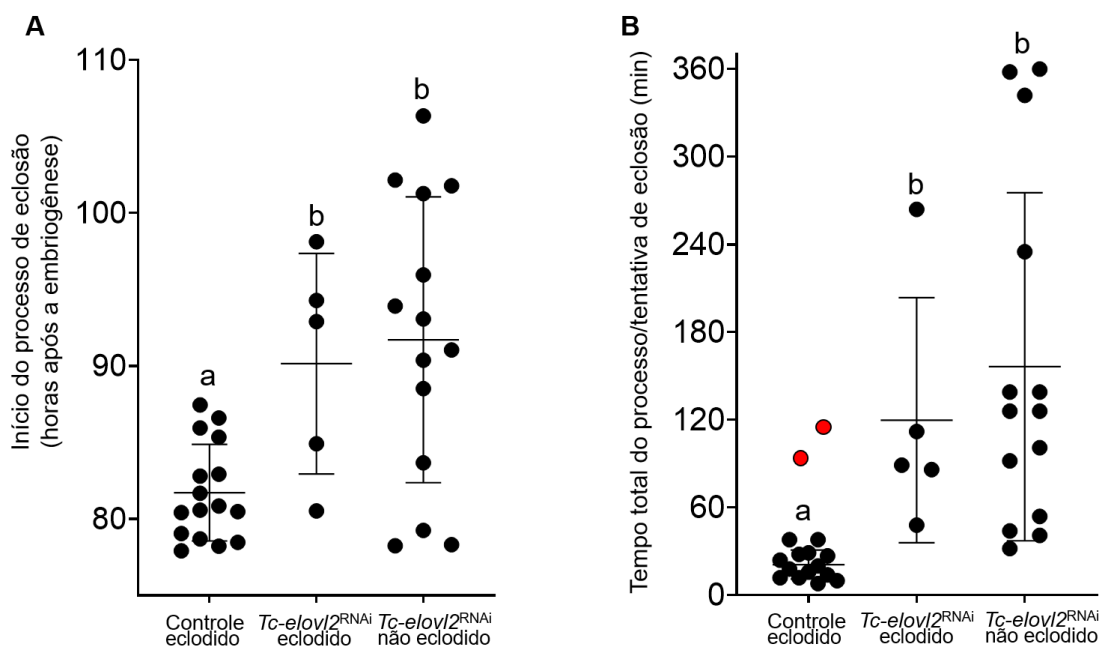
**Figura 35. Comportamento das larvas durante o processo, ou tentativa, de eclosão.** Condições e cepas estão indicadas à esquerda de cada sequência. **(A, F, K, P)** larva dentro do ovo preparando-se para eclodir. **(B, G, L, Q)** a larva começa a se movimentar e forçar a casca do ovo com a parte dorsal do corpo. **(C, R)** a casca se rompe e a larva começa a sair do ovo pela cabeça, processo que não é finalizado em **R**. **(D)** o restante do corpo da larva vai saindo do ovo. **(E)** a larva sai completamente de dentro do ovo. **(H, M)** a larva não consegue sair de dentro do ovo e começa a murchar. **(I, N, S)** a larva segue murchando e diminui de tamanho. **(J, O, T)** a larva incapaz de sair de dentro do ovo murcha completamente. Todos os ovos apresentavam idade de 76 horas de embriogêneses no início do experimento, com uma imprecisão de  $\pm 4$  horas.

Corroborando os dados descritos nos painéis P-T da Figura 36, foi observado que alguns ovos da cepa nGFP utilizados para avaliar a taxa de eclosão apresentaram o mesmo aspecto: continham uma larva morta, desidratada, com parte do corpo para fora da casca (Figura 36).



**Figura 36.** Ovo *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* da cepa nGFP de *Tribolium castaneum* após o final da embriogênese. A imagem mostra uma parte do corpo da larva de *T. castaneum*, com aspecto desidratada fora do ovo que coberta por grãos de farinha de trigo. **(A)** Vista lateral do ovo. **(B)** larva vista de trás.

Também foi contabilizada a diferença no tempo em que as larvas controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* iniciam o processo de eclosão (Figura 37). Enquanto as larvas controle de ambas as cepas demoraram em média 81 horas, desde que iniciaram a embriogênese, para iniciar a eclosão, as poucas larvas *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* que eclodiram iniciaram a eclosão com tempo médio de 90 horas de embriogênese. Já as larvas *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* que não eclodiram iniciaram o processo de tentar eclodir com 91 horas de embriogênese (Figura 37A). Com relação ao tempo total que as larvas levam para realizar todo o processo de eclosão, saindo completamente do ovo, ou morrer tentando, as diferenças são ainda mais evidentes (Figura 37B). Larvas controle demoraram em média 31 minutos para eclodir, porém é interessante destacar que dois indivíduos tiveram quase todo o corpo fora da casca do ovo após 20 e 22 minutos do início do processo, cada um, mas ficaram com a ponta da cauda presos à casca do ovo. Estes demoraram um total de 94 e 115 minutos, respectivamente, para realizar o processo por completo. As larvas *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* que eclodiram demoraram em média 120 minutos para finalizar o processo, enquanto as larvas *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* que não saíram de dentro do ovo tentaram eclodir por um período médio de 156 minutos (Figura 37B). Nos dados mostrados na Figura 37, não foram observadas diferenças entre as cepas GA-1 e nGFP (dados não mostrados). Para ambos os parâmetros, a diferença nos tempos é significativa entre ovos controle e ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* eclodidos e entre ovos controle e ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* não eclodidos.

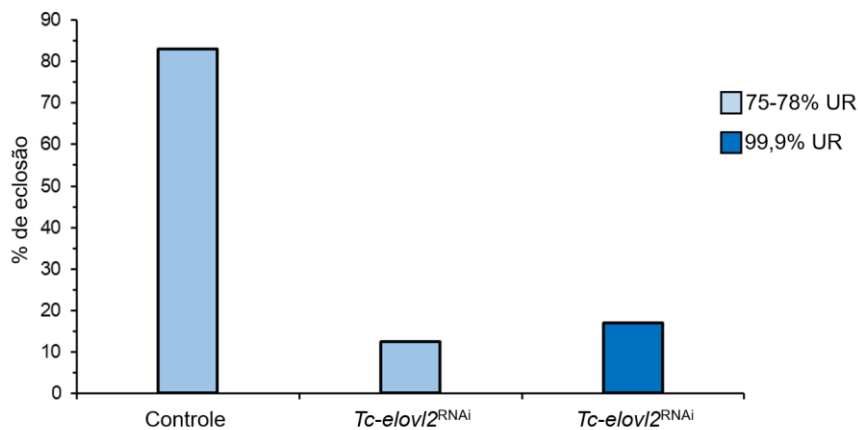


**Figura 37. O silenciamento de *Tc-elovl2* aumenta os períodos relacionados com o processo de eclosão. (A)** Idade de desenvolvimento embrionário em que as larvas das três situações (controle, silenciadas que eclodiram e silenciadas que não eclodiram) iniciaram o processo de eclosão. **(B)** Tempo total do processo de eclosão (larvas controle e silenciadas que eclodiram) e tempo total da tentativa de eclosão (para larvas silenciadas que não eclodiram). Os dois pontos vermelhos em **(B)** são larvas controle que não entraram na análise por apresentar um comportamento muito diferente dos. Foram realizados dois experimentos independentes com ovos controle e três com ovos silenciados. Letras (a, b) distintas significam diferenças significativas (teste t de Student  $P < 0,05$ ).

#### 4.4.6. A taxa de eclosão de ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* é similar nas umidades relativas de 75 e 99,9%

As larvas *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* foram murchando ao não conseguirem eclodir, ficando no final com aparência de desidratadas (Figura 36J, O, T). Em função disso, foi avaliada a taxa de eclosão dos ovos em duas umidades relativas (UR) altas, com o intuito de saber se o gene *Tc-elovl2* está relacionado a resistência a dessecação da larva ao eclodir. Nesse experimento a taxa de eclosão dos ovos controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* mantidos a 75% de UR foi de 85 e 12%, respectivamente. Em paralelo, outro conjunto de ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* foi mantido em um ambiente com 99,9% de UR e a taxa de eclosão foi de 17% (Figura 38). Este resultado indica que a alta UR não recuperou a viabilidade das larvas que tentaram eclodir, indicando que o silenciamento de *Tc-elovl2* não afeta a impermeabilização do exoesqueleto das larvas de *T. castaneum*.



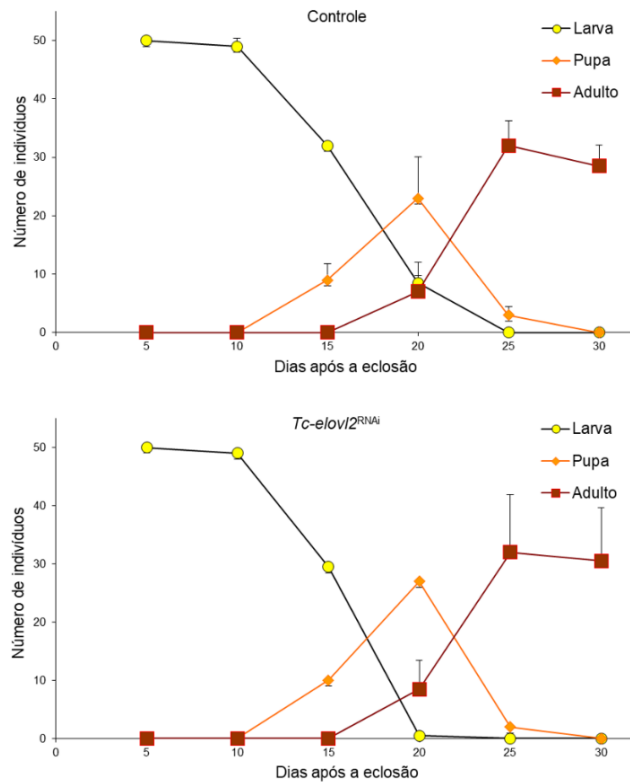


**Figura 38. Taxa de eclosão dos ovos mantidos em 75 e 99,9% de UR.** Ovos controle foram mantidos em 75% de UR enquanto os ovos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> foram mantidos em 75 e 99,9% de UR. Todos os ovos foram mantidos em estufa a 30 °C. Foi realizado um único experimento com o total de 66 ovos controle, 64 ovos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> colocados em ambiente de 75% de UR e 65 ovos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> colocados em ambiente de 99,9% de UR.

#### 4.4.7. Larvas eclodidas de ovos silenciados se desenvolvem normalmente

Após observar o efeito do silenciamento para *Tc-elovl2* na embriogênese e eclosão dos ovos foi realizado o acompanhamento das larvas até a emergência dos adultos, com 30 dias após a eclosão, a fim de verificar se as larvas que eclodiam de ovos provenientes de fêmeas injetadas com dsRNA se desenvolviam normalmente até a fase adulta.

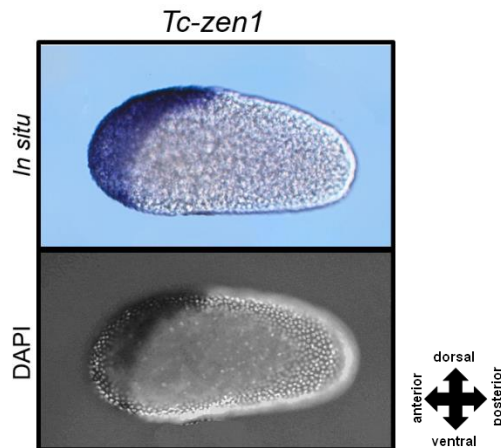
O padrão de desenvolvimento dos estágios de larva para pupa e de pupa para adulto é o mesmo entre indivíduos controle e os poucos indivíduos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> que eclodiram (Figura 39). Em ambos os grupos nos dias cinco e 10 após a eclosão ocorrem apenas larvas. As larvas viram pupas no período compreendido entre os dias 10 e 25 com a maior quantidade de pupas ocorrendo no dia 20, que também é o primeiro dia contabilizado em que as pupas já se metamorfosearam em adultos. No dia 25 quase todas as pupas se tornaram adultos. Entre os dias 25 e 30 ocorre uma pequena mortalidade dos adultos. Entre o primeiro e o último dia de acompanhamento ocorreu uma taxa global de mortalidade no grupo controle e silenciado de, respectivamente, 43 e 39%. Uma alta taxa de mortalidade também foi observada empiricamente, entre o período de sexagem das pupas e injeção dos adultos, em todos os experimentos de silenciamento que foram realizados.



**Figura 39. Acompanhamento do desenvolvimento pós-embrionário em larvas eclodidas do grupo controle e *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>*.** Os indivíduos foram acompanhados nos dias 5, 10, 15, 20, 25 e 30 após a eclosão e em cada dia foi contabilizado o número total de larvas, pupas e adultos presentes nos potes. Cada ponto indica a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes. No total foram avaliadas 100 larvas eclodidas de ovos controle e 100 larvas eclodidas de ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>*.

#### 4.4.8. O gene *Tc-elovl2* é expresso na serosa e na pleuropódia em ovos de *Tribolium castaneum*

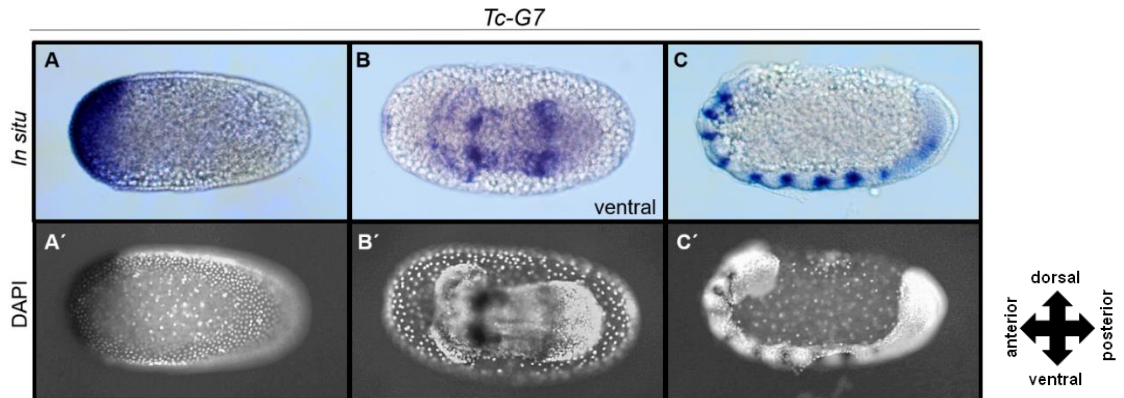
Avaliamos a expressão de *Tc-elovl2* através de hibridização *in situ* em ovos de *T. castaneum* em estágio inicial e tardio da embriogênese, com idades entre 4-20 e 48-56 horas de embriogênese, respectivamente. Para ovos do estágio inicial utilizamos as sondas antisense dos genes *Tc-zen1* e *Tc-G7* como controles positivos e a sonda senso do gene *Tc-elovl2* como controle negativo. O gene *Tc-zen1* apresentou expressão exclusiva nas células da serosa (Figura 40), conforme já descrito (Falciani *et al.*, 1996).



**Figura 40. O gene *Tc-zen1* é expresso apenas na serosa.** A coloração roxa na *in situ* (painel superior) e os pontos com fundo mais escuro no DAPI (painel inferior) indicam a expressão de *Tc-zen1* na região anterior do blastoderma celular indiferenciado que dará origem as células da serosa. No painel de DAPI, cada ponto branco indica um núcleo celular.

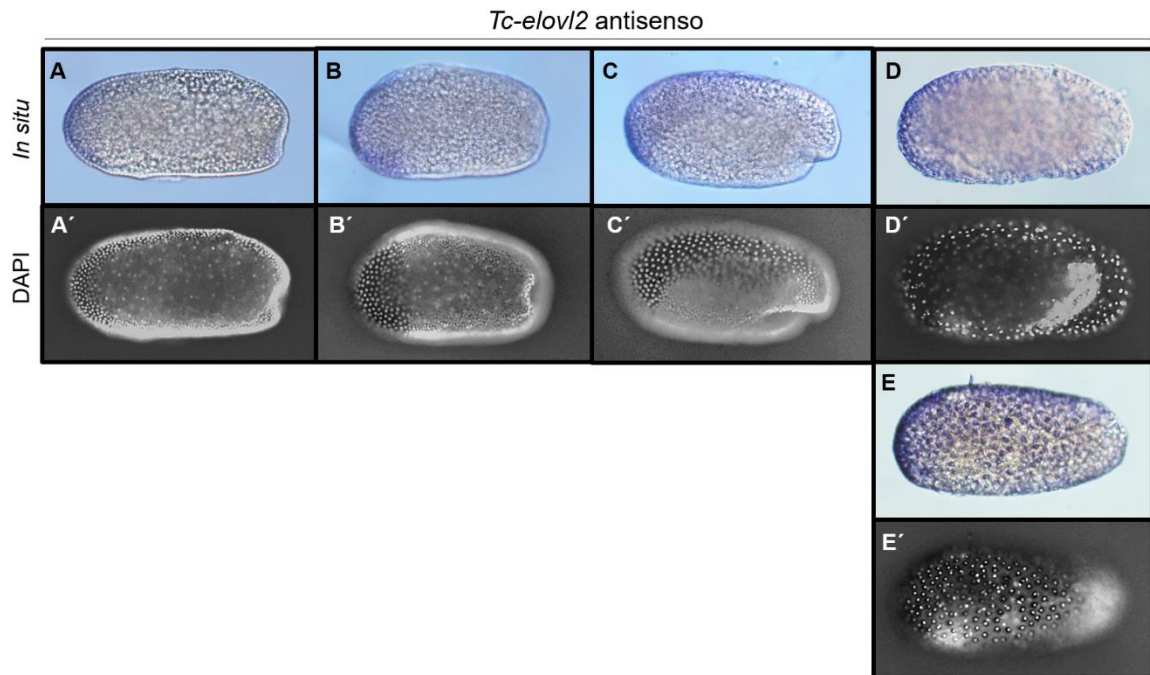
O gene *Tc-G7*, por sua vez, apresentou três tipos de marcações associadas às diferentes idades embrionárias (Figura 41). Ovos no estágio de blastoderma indiferenciado, expressão *Tc-G7* apenas na região anterior que dará origem as células da serosa (Figura 41A e A'), assim como em *Tc-zen1*. Embriões em estágios mais avançados no início da extensão da banda germinal (embrião), apresentam expressão em diferentes segmentos corporais (Figura 41B e B'). Embriões em estágios mais avançados de extensão da banda germinal, onde os segmentos começam a ficar mais definidos, apresentaram expressão na região dos segmentos (Figura 41C e C'). Essas mesmas marcações de *Tc-G7* já haviam sido observadas anteriormente, em que a sonda senso de *Tc-G7* não apresentou marcação, o que indica que as marcações da sonda antisenso são específicas (Rezende e Panfilio, dados não publicados).



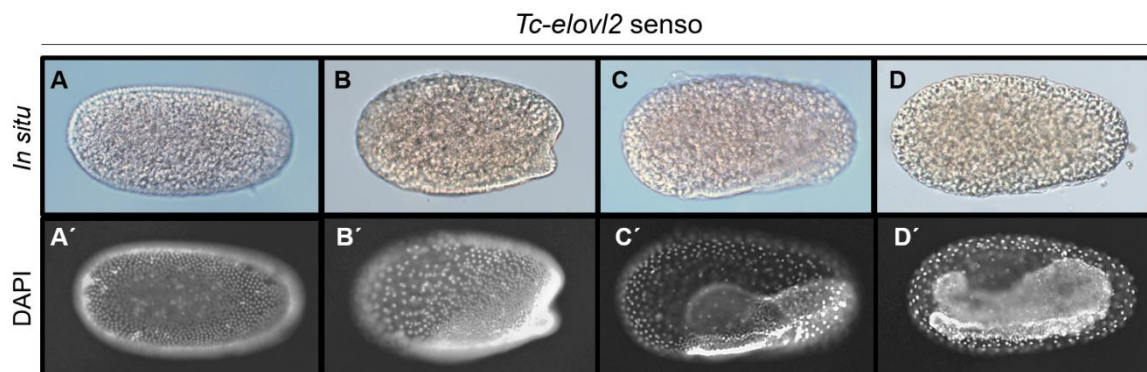


**Figura 41.** O gene *Tc-G7* é inicialmente expresso na serosa e depois nos segmentos do embrião. A coloração roxa na *in situ* e os pontos com fundo mais escuro no DAPI indicam a expressão de *Tc-G7*. (A, A') expressão nas células da serosa durante o estágio de blastoderma celular indiferenciado. (B, B') expressão segmentada no embrião no início da extensão da banda germinal. (C, C') expressão nos segmentos da banda germinal no meio de sua extensão. Letras iguais indicam o mesmo embrião. (A, C) ovos na posição lateral, (B) ovo na posição ventral.

Com relação ao gene de interesse (*Tc-elovl2*) ocorre uma expressão fraca nas células da serosa em diferentes etapas (Figura 42), diferente de *Tc-zen1* e *Tc-G7* que apresentaram expressões fortes nessas células. A expressão de *Tc-elovl2* ocorreu principalmente na região anterior do blastoderma diferenciado (Figura 42A-B') e no início da gastrulação (Figura 42C e C'). Mesmo no estágio no qual as células da serosa envolvem o embrião por completo, a expressão permaneceu fraca e na região anterior do ovo (Figura 42D e D'), com exceção para um indivíduo, em que a expressão de *Tc-elovl2* se apresentou mais forte e aumentando em direção a região posterior do ovo, começando a envolver o embrião (Figura 42E e E'). No embrião propriamente dito não houve expressão de *Tc-elovl2*. A hibridização realizada com a sonda senso de *Tc-elovl2* não marcou nenhum ovo em nenhum estágio embrionário (Figura 43).



**Figura 42. O gene *Tc-elovl2* é fracamente expresso na serosa.** A coloração roxa na *in situ* e os pontos com fundo mais escuro no DAPI indicam a expressão de *Tc-elovl2*. **(A, A')** expressão nas células da serosa na região mais anterior durante o estágio de blastoderma celular indiferenciado. **(B, B')** expressão nas células da serosa na região mais anterior durante o estágio de blastoderma celular diferenciado **(C, C')** expressão nas células da serosa que estão se expandindo para envolver o embrião no início da gastrulação. **(D, D')** expressão nas células da serosa apenas na região anterior no estágio em que a serosa já envolveu todo o embrião. **(E, E')** expressão mais forte nas células da serosa no estágio em que a serosa já envolveu todo o embrião. Letras iguais indicam o mesmo embrião. Todos os ovos estão em posição lateral com a região anterior voltada para a esquerda.

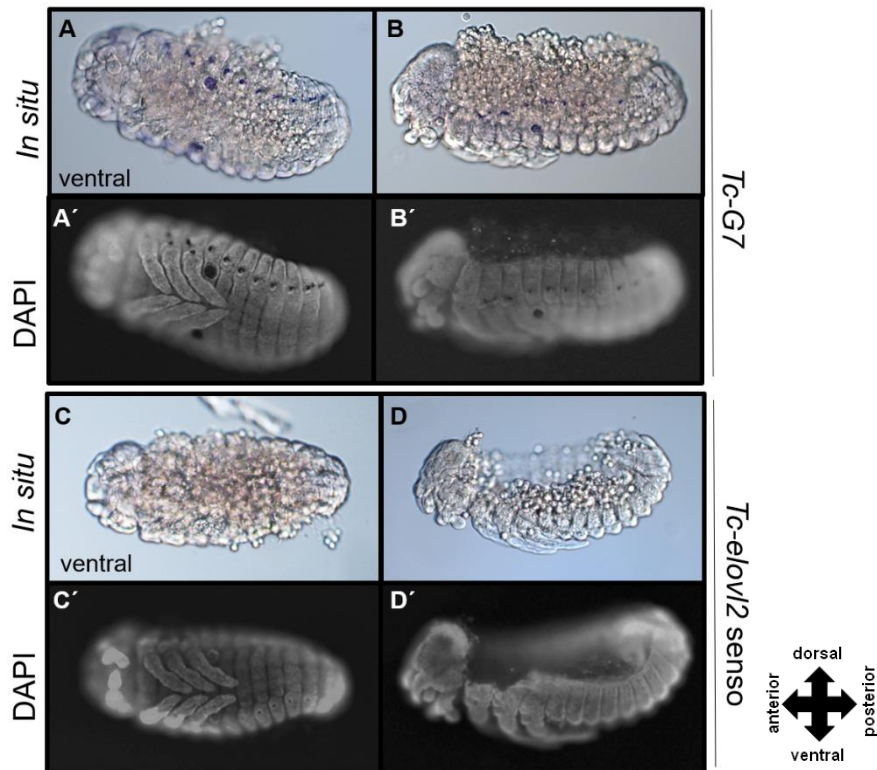


**Figura 43. A sonda senso para o gene *Tc-elovl2* não apresenta marcação.** Os painéis superiores são *in situ* que indicam que não houve marcação nos diferentes estágios embrionários, indicados pela marcação com DAPI nos painéis inferiores. **(A, A')** estágio de blastoderma celular in diferenciado. **(B, B')** estágio de início da gastrulação. **(C, C')** estágio da gastrulação em que a serosa está envolvendo a banda germinal que está condensada na região ventral do ovo. **(D, D')** extensão da banda germinal, quando a serosa já envolveu completamente o embrião.

Para embriões com idades entre 48-56 horas da embriogênese, utilizamos a sonda antisense do gene *Tc-G7* como controle positivo e a sonda senso de *Tc-elovl2* como controle negativo (Figura 44). O gene *Tc-zen1* não foi utilizado, pois para embriões nessas idades tivemos que remover a casca dos ovos deixando

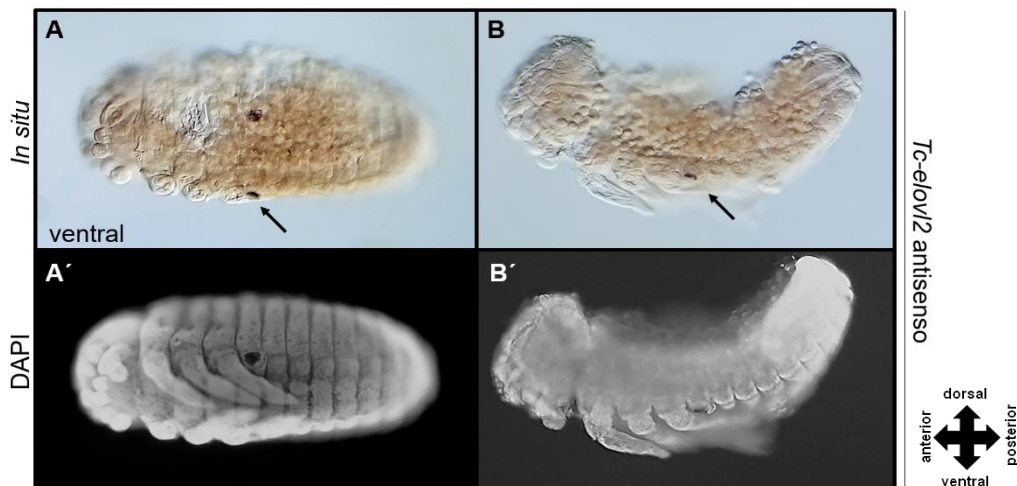
apenas o embrião e o vitelo. Dessa forma, não havia células da serosa para serem marcadas para *Tc-zen1*.

O gene *Tc-G7* foi expresso na região lateral dos segmentos torácicos e abdominais dos embriões, nas pernas e apresentou expressão na pleuropódia (Figura 44A-B'). A hibridização realizada com a sonda senso do gene *Tc-elovl2* não marcou os embriões (Figura 44C e D').



**Figura 44. Padrão de expressão de *Tc-G7* (controle positivo) e *Tc-elovl2* senso (controle negativo) em embriões tardios de *Tribolium castaneum*.** A coloração roxa na *in situ* e preta no DAPI indicam a expressão dos genes. **(A-B')** expressão de *Tc-G7* na região lateral dos segmentos abdominais e torácicos, nas pernas e na pleuropódia dos embriões. **(C-D')** sem marcação de *Tc-elovl2* nos embriões hibridizados com a sonda senso. Letras iguais indicam o mesmo embrião. **(A, C)** embriões na posição ventral, **(B, D)** embriões na posição lateral.

Os embriões cuja hibridização foi realizada com sonda antisense para *Tc-elovl2* apresentaram expressão exclusivamente na pleuropódia. (Figura 45A-B'). Em alguns desses embriões a expressão parece ser apenas na região da borda da abertura da pleuropódia (Figura 45B, B').

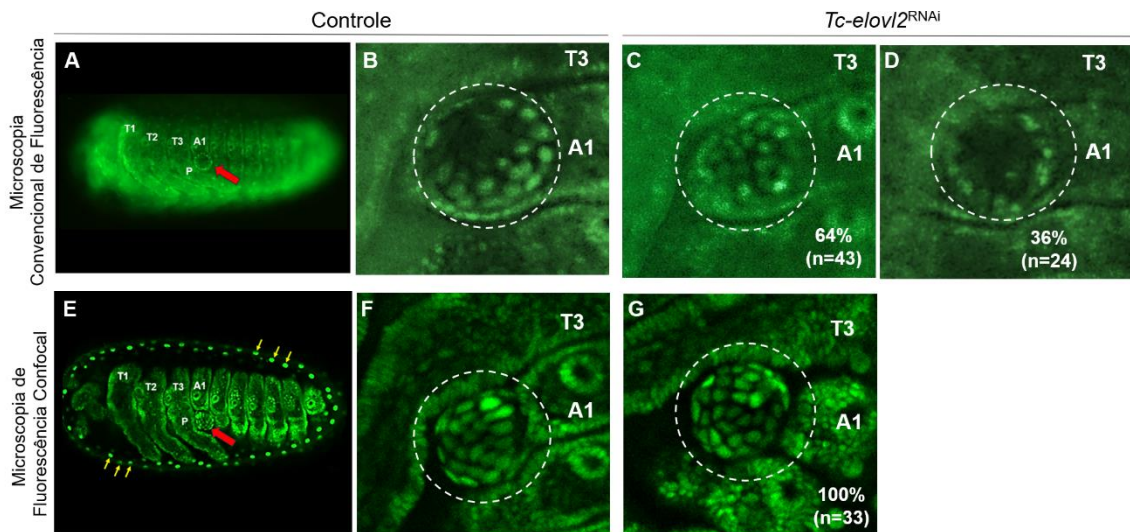


**Figura 45. Padrão de expressão de *Tc-elovl2* antisense em embriões tardios de *Tribolium castaneum*.** A coloração roxa na *in situ* e preta no DAPI indicam a expressão de *Tc-elovl2*. **(A-B')** expressão de *Tc-elovl2* na pleuropódia dos embriões. **(A, A')** embriões na posição ventral. **(B, B')** embriões na posição lateral. As setas apontam para a pleuropódia.

#### 4.4.9. Comparação da pleuropódia de embriões controle e *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup>

Os resultados anteriores mostram que os embriões de *T. castaneum* *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> possuem morfologia externa normal, são viáveis e que *Tc-elovl2* é expresso na pleuropódia. Assim, a hipótese de trabalho é que *Tc-elovl2* é importante para a formação e/ou função da pleuropódia, que atua para fragilizar a casca do ovo e permitir a eclosão de diversos insetos. Foi realizada uma comparação da estrutura da pleuropódia de embriões controle e *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> (Figura 46). Inicialmente a comparação foi realizada através de microscopia convencional de fluorescência, que indicou que os embriões *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> possuíam pleuropódia, mas que 36% desses embriões pareciam ter menos núcleos do que as células da pleuropódia de embriões controle, os outros 64% possuíam pleuropódia iguais às do controle (Figura 46A-C). No entanto, devido à baixa resolução das imagens da pleuropódia obtidas pela microscopia convencional de fluorescência, esse resultado foi considerado como inconclusivo. Em seguida foram feitas observações da pleuropódia no microscópio de fluorescência confocal, com maior resolução (Figura 46D, E). Esta análise mostrou que a pleuropódia de embriões *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> possui estrutura aparentemente igual à dos embriões controle.





**Figura 46. Microscopia de fluorescência convencional e confocal da pleuropódia de embriões de *Tribolium castaneum*.** Ovos da cepa nGFP com idade entre 48-56 horas de embriogênese foram utilizados. **(A-D)** microscopia convencional de fluorescência. **(E-G)** microscopia confocal de fluorescência. **(A, E)** Embriões inteiros. Em **E** o embrião está envolto pelas células da serosa. As setas amarelas indicam algumas células da serosa. **(B- G)** Região da pleuropódia em detalhe. O círculo tracejado envolve a pleuropódia e as setas vermelhas indicam a pleuropódia nos embriões inteiros. T1, T2 e T3: 1º, 2º e 3º segmento torácico, respectivamente. A1: 1º segmento abdominal. P: perna. Foram analisados 73 ovos controle e 67 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* na microscopia convencional e 21 ovos controle e 33 ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* na microscopia confocal.

## 4.5. DISCUSSÃO

Vários aspectos podem determinar o sucesso da vida de um inseto, e o êxito no momento da eclosão é um deles. Em seguida serão discutidas algumas hipóteses que poderiam responder a relação do gene *Tc-elovl2* com a eclosão dos ovos de *T. castaneum* e aspectos relacionados ao silenciamento via pRNAi.

### 4.5.1. A expressão de *Tc-elovl2* em *Tribolium castaneum*

A técnica de RT-PCR indicou que *Tc-elovl2* é expresso no ovário e no resto da fêmea adulta de *T. castaneum*. A expressão no ovário permite uma hipótese de que o efeito do silenciamento observado seja em resposta a um possível efeito materno no ovo, ou seja, a ausência de *Tc-elovl2* na fêmea adulta antes da produção e postura de ovos resultaria no fenótipo observado na eclosão. No entanto, não sabemos quantitativamente o nível da expressão de *Tc-elovl2* no ovário e no resto da fêmea e se há diferença entre eles.

### 4.5.2. A duração e efeito do silenciamento em ovos de *Tribolium castaneum* nas cepas GA-1 e nGFP

O silenciamento gênico através da técnica de RNAi permite investigar a função dos mais variados genes. Essa técnica é bem difundida no modelo *T. castaneum* e já foi testada através da injeção de dsRNA em estágios embrionários (Brown *et al.*, 1999), pupas (Bucher *et al.*, 2002), em larvas de último instar (Tomoyasu e Denell, 2004; Miller *et al.*, 2008; 2012) e adultos (Arakane *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Vargas, 2019; Horn *et al.*, 2022). A injeção da dsRNA em fêmeas adultas deste besouro permite a análise da função de genes nos embriões descendentes e ao contrário da injeção em outras fases do ciclo de vida, a fase adulta quando injetada apresenta uma menor letalidade, principalmente nos casos de silenciamento de genes relacionados com a produção de cutícula/exoesqueleto, que muitas vezes é fatal para larvas e pupas. Além disso, a injeção não deixa as fêmeas estéreis, como já foi registrado em pupas depois de injeções de dsRNA para determinados genes (Posnien *et al.*, 2009). A injeção em larvas geralmente é realizada para analisar a atuação de genes no processo de metamorfose (Tomoyasu e Denell, 2004).

O silenciamento de um determinado gene por RNAi em *T. castaneum* possui um efeito transiente, ou seja, o efeito diminui com o tempo e o gene volta a ser expresso. Isso ocorre devido a degradação gradual das moléculas de dsRNA injetadas no inseto (Bucher *et al.*, 2002).

O efeito do silenciamento de *Tc-elovl2* na eclosão dos ovos de *T. castaneum* tem uma durabilidade com seu ponto médio em aproximadamente 21 e 10 dias em ovos da cepa GA-1 e da cepa nGFP, respectivamente.

Variações na duração do silenciamento entre cepas de *T. castaneum* também foram registradas por Horn e colaboradores (2022). O estudo mostrou que em uma das cepas o efeito do silenciamento diminuiu em um intervalo de 10 dias, enquanto na outra o efeito foi mais persistente, com duração de 20 a 34 dias. Para as duas cepas, a duração do silenciamento foi independente do gene utilizado. Por outro lado, Vargas (2019) analisou o efeito e a duração do silenciamento em diferentes genes, incluindo genes *elovl*, em ovos de *T. castaneum* da cepa GA-1. Foi demonstrado que o tempo de silenciamento pode variar dependendo do gene. Para os genes *elovl* o silenciamento durou 31 dias, porém o silenciamento foi feito em conjunto para quatro genes dessa família. Para os genes *Tc-zen1* e *Tc-verm* o silenciamento durou 41 dias. Diferenças na duração do silenciamento entre genes

também foi relatado por Bucher e colaboradores (2002) ao realizar o silenciamento do gene que determina a perna *Distalless* (*Tc'Dll*) e o gene homeótico *maxillopedia* (*mxp*) em *T. castaneum*. Foi observado uma queda de 20% no fenótipo de silenciamento na segunda semana após a injeção da dsRNA para o gene *mxp* e essa mesma porcentagem só foi atingida na quarta semana após a injeção para o gene *Tc'Dll*.

Diante desses dados, reconhecemos a importância da análise temporal do efeito de silenciamento para cada cepa e gene estudado, a fim de determinar o melhor período para a realização da pesquisa genética e de desenvolvimento em *T. castaneum*.

#### **4.5.3. O efeito do silenciamento de *Tc-elovl2* via RNAi na taxa de eclosão dos ovos e morfologia dos embriões de *Tribolium castaneum***

No presente trabalho observamos que o silenciamento de *Tc-elovl2* realizado através de injeção de dsRNA em fêmeas adultas impede a eclosão dos ovos de *T. castaneum*, mas os embriões se desenvolvem normalmente. Resultados semelhantes foram relatados por Zhu e colaboradores (2008) com o silenciamento via RNAi de uma quitinase (*TcCHT10*) que impediu a eclosão dos ovos contendo embriões perfeitamente desenvolvidos. Acredita-se que *TcCHT10* pode ser necessária para digerir a quitina presente na casca do ovo. Essa hipótese está de acordo com os resultados de Jacobs e colaboradores (2013) que observou a existência de camadas de quitina na cutícula serosa.

Diferente de *TcCHT10* que atuam em vias de degradação quitina, *Tc-elovl2* está relacionado a síntese de ácidos graxos de cadeia muito longa que pode originar diferentes classes de lipídios. Assim como *TcCHT10* pode ser importante para a digestão de quitina presente na cutícula serosa que compõe a casca do ovo, *Tc-elovl2* também pode estar envolvido, de alguma forma, na degradação da cutícula serosa (essa hipótese será melhor discutida no item 4.5.5). Desta maneira, o silenciamento de *Tc-elovl2* dificultaria a digestão da cutícula serosa, impedindo a eclosão dos ovos. Entretanto, será necessário a realização de experimentos futuros para comprovar essa hipótese, como a análise comparativa da espessura da cutícula serosa em ovos controle e *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup>, ou o silenciamento conjunto de *Tc-elovl2* e *Tc-zen1*. Tendo em vista que *Tc-zen1* codifica um fator de transcrição

essencial para a definição da serosa e formação de sua cutícula, ovos provenientes desse silenciamento duplo deveriam apresentar taxas normais de eclosão.

#### **4.5.4. O efeito do silenciamento de *Tc-elovl2* no processo de eclosão das larvas de *Tribolium castaneum***

Como já foi mencionado, larvas provenientes de ovos *Tc-elovl2*<sup>RNAi</sup> das duas cepas estudadas não conseguem finalizar o processo de eclosão, porém o comportamento durante a tentativa de sair de dentro do ovo é semelhante aos das larvas controle. O fato de as larvas silenciadas conseguirem se movimentar ativamente dentro do ovo na tentativa de eclodir, mostra que além de possuírem um corpo perfeitamente formado, elas também são viáveis. No entanto, as larvas murcham depois de passarem horas tentando eclodir.

Quatro hipóteses poderiam explicar esse efeito. As larvas murcharam em decorrência da desidratação pela perda de água. Para isso, *Tc-elovl2* estaria envolvido na resistência a dessecação. De fato, a cutícula que recobre o corpo dos insetos possui uma epicutícula constituída de cera e outros compostos hidrofóbicos, como hidrocarbonetos que atuam como uma barreira contra a perda de água (Chapman, 2013). Vargas (2019) já havia observado que a taxa de eclosão dos ovos silenciados para *Tc-elovl2* é baixa tanto em 5% como em 75% de umidade relativa (UR). Contudo, o trabalho realizado com uma oxidase (*duox*) em *Rhodnius prolixus*, mostrou que a baixa viabilidade dos ovos em 75% UR só é recuperada em uma UR ainda maior (>96% de UR) (Dias *et al.*, 2013). No entanto, para *Tc-elovl2* essa hipótese foi descartada, pois os ovos silenciados quando postos em 99,9% de UR seguiram apresentando uma baixa viabilidade.

A segunda hipótese se refere à secreção de substâncias no espaço extraembrionário que seria letal para a larva presa dentro do ovo. A hipótese de que a serosa, assim como a pleuropódia, secreta substâncias que degradam a cutícula serosa (Novak e Zambre, 1974 *apud* Konopová *et al.*, 2020) é sustentada pela expressão da quitinase *TcCHT10* na serosa (Jacobs *et al.*, 2015). Nesse cenário, a serosa antes de degenerar liberaria algumas das enzimas que degradam a quitina que compõe a cutícula serosa, mas estas não seriam suficientes para digerir a cutícula serosa por completo. A presença dessas substâncias em contato prolongado com a larva, que tentou durante horas, mas não conseguiu sair de



dentro do ovo, poderia acabar degradando a cutícula da larva, que assim murchou rapidamente. Esta ideia, porém, precisaria ser testada.

A terceira hipótese é a de que o esforço energético empregado pela larva para tentar sair de dentro do ovo seria tão grande que, após horas, o estoque de ATP da larva foi exaurido, o que levou a um desequilíbrio na homeostase da larva e ao seu murchamento.

A última hipótese estaria relacionada a quantidade de nutrientes disponíveis para o desenvolvimento do embrião e alimentação da larva até o momento da eclosão. Como as larvas que não eclodem demoram horas tentando eclodir, os nutrientes disponíveis dentro do ovo para manter a larva viva pode não ser suficiente para o tempo que ela fica dentro do ovo e, por isso, a larva que não eclodiu estaria morrendo de fome em detrimento da falta de nutrientes.

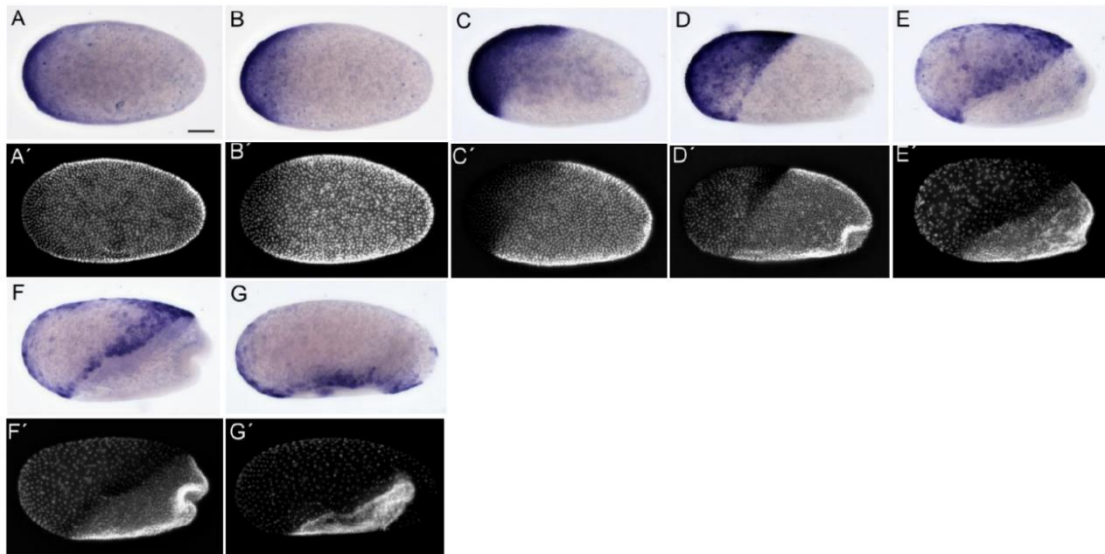
Também ocorrem alterações no tempo em que as larvas de ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* iniciam o processo de eclosão e no tempo em que as larvas de ovos *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* levam para eclodir (aquelas poucas que conseguem). Esses atrasos podem estar relacionados à mecanismos ainda desconhecidos que sinalizam para larva que chegou o momento de eclodir, visto que quando *Tc-elovl2* é silenciado algum processo é alterado e impede a eclosão. Dessa forma, as larvas ou o próprio ovo não estariam prontos para a eclosão e o processo seria atrasado. Esta hipótese é corroborada por estudos com diferentes insetos que mostraram que diversos fatores, sejam eles externos ou internos, podem inibir ou estimular o processo de eclosão dos ovos. O trabalho de Campos e colaboradores (2021) realizado com diferentes populações de *Aedes aegypti*, por exemplo, mostrou que populações de regiões mais frias apresentam uma inibição adaptativa da eclosão dos ovos. Por outro lado, ovos do besouro *Nicrophorus vespilloides*, tendem a eclodir mais cedo e de forma síncrona com ovos irmãos, quando na ausência de cuidado parental, que é naturalmente fornecida por *N. vespilloides* para suas crias (Jarret *et al.*, 2018). Na cigarra *Cryptotympana facialis* é a alta umidade relativa que induz a eclosão e garante a sobrevivência das ninfas (Moriyama e Numata, 2006). Nos gafanhotos *Schistocerca gregaria* e *Locusta migratoria* foi comprovado que o termoperíodo desempenha um papel importante no controle do tempo de eclosão dos insetos criados em laboratório, mas não no seu ambiente natural (Nishide *et al.*, 2015).

#### 4.5.5. *Tc-elovl2* é expresso nas células da serosa e na pleuropódia

A hibridização *in situ* mostrou que *Tc-elovl2* é expresso nas células da serosa durante o desenvolvimento embrionário inicial de *T. castaneum* e exclusivamente na pleuropódia em embriões em estágios mais tardios, entre 48 e 56 horas da embriogênese.

O gene *Tc-zen1* apresenta uma expressão forte nas células da serosa desde o estágio de blastoderma celular indiferenciado e a expressão se expande gradativamente da região anterior do ovo para a região posterior durante a gastrulação, até a serosa envolver o embrião (Gurská, 2007) (Figura 47). Diferente desse padrão, a expressão de *Tc-elovl2* na serosa é fraca e restrita a região anterior do ovo, mesmo em estágios em que a serosa já envolveu o embrião por completo.

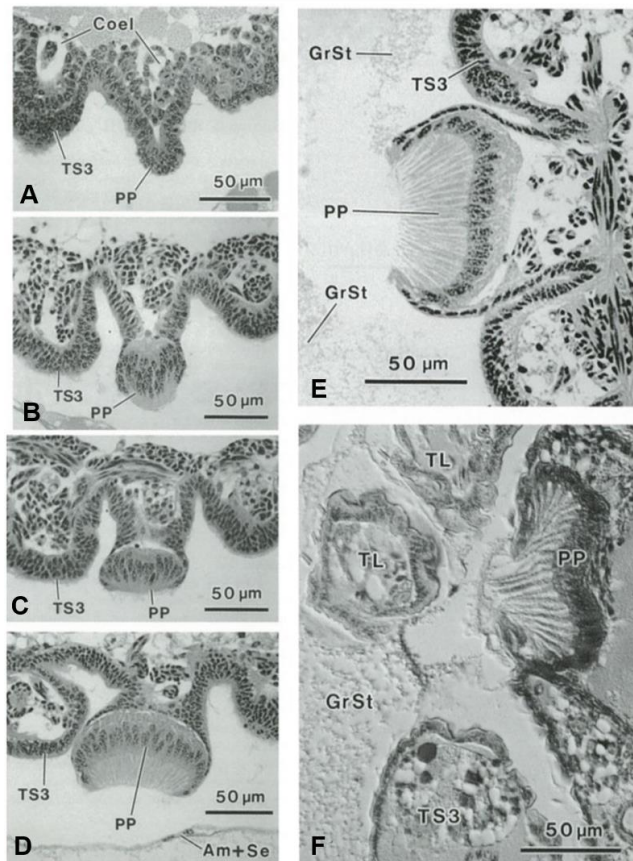
Em apenas um ovo a expressão de *Tc-elovl2* foi mais forte e se expandiu para a região posterior do ovo, quando a serosa está envolvendo o embrião. Uma hipótese proposta para essa exceção, é a possibilidade do gene *Tc-elovl2* atuar na defesa imunológica contra microorganismos patogênicos, assim como já foi relatado para outros genes *elovl* de insetos (Dong *et al.*, 2015; Hasan *et al.*, 2019). Tendo em vista que a serosa é um dos tecidos extraembrionários responsáveis por proteger o embrião contra o ataque de patógenos (Jacobs *et al.*, 2014), *Tc-elovl2* apresentaria maiores taxas de expressão na serosa como resposta imune contra patógenos que estariam contaminando este ovo. Curiosamente, uma função imune também foi proposta para a pleuropódia (Konopová *et al.*, 2020), o outro tecido em que *Tc-elovl2* é expresso.



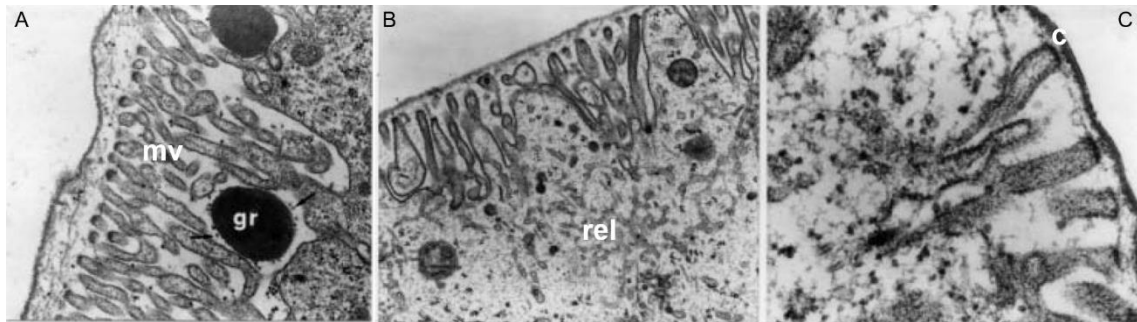
**Figura 47. Padrão de expressão de *Tc-zen1* durante a embriogênese inicial de *Tribolium castaneum*.** A coloração roxa na *in situ* e os pontos com fundo mais escuro no DAPI indicam a expressão de *Tc-zen1* nas células da serosa que se expande da região anterior do ovo para a região posterior até envolver o embrião. **(A-C')** expressão nas células da serosa durante estágios de blastoderma celular indiferenciado. **(D e G')** expressão nas células da serosa durante estágios de gastrulação. Letras iguais indicam o mesmo embrião. Ovos na posição lateral com a região dorsal para a esquerda e ventral para baixo. A barra de escala em (A) representa 100  $\mu$ m. Fonte: adaptado de Gurská (2017).

Em contrapartida, considerando que a pleuropódia secreta, em muitos insetos, enzimas que digerem a cutícula serosa para facilitar a eclosão dos ovos, as evidências circunstanciais apontam uma relação entre *Tc-elovl2<sup>RNAi</sup>* e a pleuropódia e, portanto, os processos conhecidos sobre essa estrutura serão detalhados a seguir. A pleuropódia é um órgão transitório, que se desenvolve gradualmente ao longo do desenvolvimento embrionário, degenera-se no final da embriogênese (Kobayashi *et al.*, 2003) (Figura 48), assim como a maioria dos aparatos utilizados pelos insetos para eclodir, já que geralmente essas estruturas não exercem funções pós-embrionária (Perez de La Fuente *et al.*, 2019). Em alguns insetos, a pleuropódia é evaginada, apresentando-se como um órgão externo e em outros é invaginada no interior do corpo (Wheeler, 1890 *apud* Konopová *et al.*, 2020). Estudos da ultraestrutura da pleuropódia mostraram que em alguns insetos a pleuropódia quando totalmente formada é composta por um epitélio formado por uma única camada de células longas com grânulos de secreção dentro e fora delas, têm microvilosidades apicais desenvolvidas, mitocôndrias abaixo e dentro das microvilosidades, retículo endoplasmático rugoso e liso e vários lisossomos. Após a secreção das enzimas todo o órgão é revestido por uma cutícula embrionária fina

(Kobayashi *et al.*, 2003; Rost *et al.*, 2004; Viscuso e Sottile, 2008; Konopová *et al.*, 2020) (Figura 49). No entanto, em algumas espécies não foram encontrados grânulos secretores, como relatado para a pleuropódia do besouro *Rhizotrogus majalis* (Louvet, 1983). A morfologia da pleuropódia pode variar entre espécies, apresentando forma de bulbo, filamento ou cálice, como descrito para diferentes baratas (ordem Blattodea) (Lambiase *et al.*, 2003).



**Figura 48. Microscopia de campo claro convencional de cortes longitudinais da pleuropódia de um embrião de *Rhagophthalmus ohbai* em diferentes idades embrionárias. (A-D)** pleuropódia em desenvolvimento em embriões com, respectivamente, 10, 13, 14 e 17 dias de embriogênese. **(A)** a pleuropódia aparece apenas como um apêndice no primeiro segmento abdominal sem diferenciação das células ectodérmicas ao redor. **(B)** a pleuropódia se desenvolve em uma estrutura globulosa com células longas que podem ser diferenciadas das células ectodérmicas. **(C)** a mono camada de células da pleuropódia apresenta uma estrutura semelhante a um disco com superfície plana. **(D)** as células da pleuropódia se tornam maiores e mais largas aumentando o diâmetro do órgão como um todo. **(E)** pleuropódia de um embrião com 18 dias de embriogênese. Neste estágio a pleuropódia muda de forma, a parte mais distal das células se tornam ainda mais alongadas e os núcleos ficam mais próximos a parte proximal. Acredita-se que é nesse estágio que a pleuropódia secreta grânulos com enzimas que degradará a cutícula serosa. **(F)** pleuropódia em degeneração retraindo-se para dentro do corpo de um embrião com 27 dias de embriogênese. TS3: 3º segmento torácico, PP: pleuropódia, GrST: substância granular, TL: perna torácica, Am+Se: âmnio + serosa.



**Figura 49. Microscopia eletrônica de transmissão da ultraestrutura da pleuropódia de *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera).** Os cortes mostram: **(A)** as microvilosidades (mv) e os grânulos de secreção (gr) da pleuropódia, **(B)** retículo endoplasmático liso (rel) e **(C)** cutícula embrionária (c) que recobre a pleuropódia em processo de degradação. Fonte: adaptado de Viscuso e Sottile, 2008.

Recentemente, Konopová e colaboradores (2020) demonstraram através de análises de transcriptoma que a pleuropódia do gafanhoto *Schistocerca gregaria* expressa genes associados à degradação de quitina (quitinases e N-acetylglucosaminidase) e transporte de íons (V-ATPase e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase) e relacionados a imunidade, indicando que este órgão, além de ter uma função na degradação da cutícula serosa, teria um papel na defesa imunológica embrionária. Os autores também demonstraram que genes de metabolismo de lipídeos estão entre os transcritos mais abundantes. Outras funções como regulação osmótica e iônica já foram associadas à pleuropódia, porém estas ainda não foram comprovadas (Stay, 1977).

O besouro *T. castaneum* também possui uma pleuropódia bem desenvolvida (Prpic, 2001) que desaparece no final da embriogênese, assim como relatado para outros insetos. No entanto, até o momento não existem trabalhos sobre a funcionalidade da pleuropódia em *T. castaneum*. Possivelmente, enzimas secretadas pela serosa e pela pleuropódia atuam em conjunto para a degeneração da quitina que constitui a parte interna da cutícula serosa no *T. castaneum*, possibilitando a eclosão das larvas.

Com base nas características descritas para pleuropódia, a hipótese sugerida para a atuação de *Tc-elovl2* neste órgão seria que *Tc-elovl2* estaria envolvido na síntese de ácidos graxos de cadeia muito longa que seria importante na estabilização de proteínas de transporte na membrana plasmática, como já foi relatado em levedura (Gaigg *et al.*, 2006). A pleuropódia apresenta perfil morfológico de um órgão secretor e expressa genes associados ao transporte ativo (Louvet,

1983; Rost *et al.*, 2004; Viscuso e Sottile, 2008; Konopová *et al.*, 2020). Ou seja, caso a bicamada lipídica dessas células como um todo e/ou a presença de proteínas específicas de membrana fossem comprometidas, após o silenciamento de *Tc-elovl2*, a pleuropódia não conseguiria exercer a sua função de órgão secretor.

#### **4.5.6. A pleuropódia de embriões silenciados para *Tc-elovl2***

Inicialmente observamos a pleuropódia de embriões silenciados através de microscopia convencional de fluorescência. Os resultados dessa análise mostraram equivocadamente que 36% das pleuropódias dos embriões silenciados tinham menos núcleos celulares que as do controle. Provavelmente as limitações desse tipo de microscopia, como a baixa resolução das imagens obtidas quanto à qualidade do foco, tenham influenciado neste resultado. Posteriormente, a obtenção de imagens de alta resolução adquiridas através de microscopia de fluorescência confocal mostrou que a pleuropódia de embriões silenciados era igual as dos embriões controle. No entanto, a microscopia utilizada (marcação de GFP nuclear) só nos permite realizar análises diretas referentes aos núcleos celulares e número de células e análises indiretas relacionadas com o tamanho e forma celular. Seria interessante um estudo mais aprofundado que utilize microscopia eletrônica de transmissão para avaliar possíveis alterações na ultraestrutura da pleuropódia dos embriões silenciados.

#### **4.6. CONCLUSÕES**

- 1) O gene *Tc-elovl2* é essencial para a eclosão das larvas do besouro *Tribolium castaneum*;
- 2) A ausência de *Tc-elovl2* não altera a morfologia do embrião, ocasiona um atraso no processo de eclosão e é letal para as larvas que não conseguem eclodir;
- 3) A expressão tardia de *Tc-elovl2* exclusivamente na pleuropódia indica um papel importante desse gene no correto funcionamento deste órgão;
- 4) Embora a pleuropódia de embriões silenciados seja igual às do controle, quando analisados em microscopia confocal, a funcionalidade do órgão não foi comprovada.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agbaga, M.P.; Brush, R.S.; Nawajes, M.; Mandal, A.; Henry, K.; Elliott, M.H.; Anderson, R.E. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. **PNAS**, vol. 105, no. 35, p. 12843–12848, 2008.

Arakane, Y.; Specht, C.A.; Kramer, K.J.; Muthukrishnan, S.; Beeman, R.W. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 10, p. 959-962, 2008.

Arnaud, L.; Haubruge, E.; Gage, M.J.G. Morphology of *Tribolium castaneum* male genitalia and its possible role in sperm competition and cryptic female choice. **Belgian Journal of Zoology**, v. 131, n. 2, p. 111-115, 2001.

Belles, X. Beyond Drosophila: RNAi In Vivo and Functional Genomics in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 111–28, 2009.

Bond, L.M.; Miyazaki, M.; O'Neill, L.M.; Ding, F.; Ntambi, J.M. Fatty Acid Desaturation and Elongation in Mammals, in: Ridgway, N.D.; Mcleod, R.S. (Orgs.), **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. Elsevier. Cap 6, p. 185-208, 2016.

Brown, S.J.; Holtzman, S.; Kaufman, T.C.; Denell, R.E. Characterization of the *Tribolium Deformed* ortholog and its ability to directly regulate *Deformed* target genes in the rescue of a *Drosophila Deformed* null mutant. **Development Genes and Evolution**, v. 209, n. 7, p. 389-398, 1999.

Brown, S.J.; Patel, N.H.; Denell, R.E. Embryonic expression of the single *Tribolium* engrailed homolog. **Developmental Genetics**, v.15, n. 1, p. 7-18, 1994.

Brown, S.J.; Shippy, T.D.; Miller, S.; Bolognesi, R.; Beeman, R.W.; Lorenzen, M.D. *et al.* The Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): A Model for Studies of Development and Pest Biology. **Cold Spring Harbor Protocols**, v.8, 2009.

Bucher, G., 2009. **The Beetle Book**.

Bucher, G., Scholten, J., Klingler, M. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). **Current Biology**, v. 12, p. 85-86, 2002.

Cameron, D.J.; Tong, Z.; Yang, Z.; Kaminoh, J.; Kamiyah, S.; Chen, H. *et al.* Essential role of *Elov4* in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. **International Journal of Biological Science**, v. 6, n. 3, p. 111–9, 2007.

Campos, R.E.; Zanotti, G.; Di Battista, C.M.; Gimenez, J.O.; Fischer, S. Differential inhibition of egg hatching in *Aedes aegypti* populations from localities

with different winter conditions. **Bulletin of Entomological Research**, v. 111, n. 3, p. 323-330, 2021.

Carmona-Antoñanzas, G.; Monroig, O.; Dick, J.R.; Davie, A.; Tocher, D.R. Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C>24) in Atlantic salmon: cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an *Elovl4* elongase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 159, n. 2, p. 122-129, 2011.

Caspi, R. **Enzyme Nomenclature News: On the nomenclature of fatty acids**. ExplorEnz - The Enzyme Database, 2020.

Castro, L.F.C.; Tocher, D.R.; Moroin, O. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and *Elovl* gene repertoire. **Progress in Lipid Research**, v. 62, p. 25-40, 2016.

Chapman, R.F. **The insects: structure and function**. Cambridge University Press, 1998.

Chapman, R.F.; Simpson, S.J.; Douglas, A.E. **The insects: structure and function**. Cambridge University Press, 2013.

Chen, J.; Wu, Y.C.; Chen, J.K.; Zhu, X.J.; Merkler, D.; Liao, C.H.; Han, Q. Elongases of Long-Chain Fatty Acids ELO2 and ELO9 Are Involved in Cuticle Formation and Function in Fecundity in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Insects**, v. 14, n. 2, p.189, 2023.

Chen, Y.; Kelly, E.E.; Masluk, R.P.; Nelson, C.L.; Cantu, D.C.; Reilly, P.J. Structural classification and properties of ketoacyl synthases. **Protein Science**, v. 20, n. 10, p. 1659-1667, 2011.

Chertemps, T.; Duportets, L.; Labeur, C.; Ueda, R.; Takahashi, K.; Saigo, K. *et al.* A female-biased expressed elongase involved in long-chain hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n. 11, p. 4273-4278, 2007.

Chertemps, T.; Duportets, L.; Labeur, C.; Wicker-Thomas, C. A new elongase selectively expressed in *Drosophila* male reproductive system. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 333, p. 1066–1072, 2005.

Chung, H.; Loehlin, W.L.; Dufour, E.D.; Vaccarro, K.; Millar, J.G.; Carroll, S.B. A Single Gene Affects Both Ecological Divergence and Mate Choice in *Drosophila*. **Science**, v. 343, n. 6175, p. 1148-1151, 2014.

Combs, P.A.; Joshua, J.K.; Neil, M.K.; Dennis, B.; Dmitri A.P.; Joel D.L.; Hunter, B.F. Tissue-Specific cis-Regulatory Divergence Implicates *eloF* in Inhibiting Interspecies Mating in *Drosophila*. **Current Biology**, v. 28, p. 3969-3975, 2018.



Cook, H.W.; McMaster, C.R. **Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes**. In: Vance, D.E., Vance, J.E. (eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 4ª edição. Elsevier, Amsterdam, p. 181-204, 2002.

Danielsen, E.T.; Moeller, M.E.; Yamanaka, N.; Ou, Q.; Laursen, J.M.; Soenderholm, C. et al. A *Drosophila* genome-wide screen identifies regulators of steroid hormone production and developmental timing. **Developmental Cell**, v. 37, n. 6, p. 558–570, 2016.

Denic, V.; Weissman, J.S. A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell*, v.130, n. 4, p. 663-677, 2007.

Dhadialla, T.S.; Hays, A.R.; Raikhel, A.S. Characterization of the solubilized mosquito vitellogenin receptor. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 22, n. 8, p. 803–816, 1992.

Dias, F.A.; Gandara, A.C.; Queiroz-Barros, F.G.; Oliveira, R.L.; Sorgine, M.H.; Braz, G.R. et al. Ovarian dual oxidase (Duox) activity is essential for insect eggshell hardening and waterproofing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 49, p. 35058-35067, 2013.

Dong, X.; LI, Q.; Zhang, H. The *noa* gene is functionally linked to the activation of the Toll/Imd signaling pathways in *Bactrocera dorsalis* (Hendel). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 55, p 233- 240, 2015.

Eberhard, W. Copulatory courtship and cryptic female choice in insects. **Biological Reviews**, v. 66, p. 1-31, 1991.

Engelmann, F. Insect vitellogenin: identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. **Advances in Insect Physiology**, v.14, p. 49-108, 1979.

Falciani, F.; Hausdorf, B.; Schröder, R.; Akam, M.; Tautz, D.; Denell, R.; Brown, S. Class 3 Hox genes in insects and the origin of zen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n.16, p. 8479-8484, 1996.

Falcon, T.; Ferreira-Caliman, M.J.; Nunes, F.M.F.; Tanaka, E.D.; Nascimento, F.S.; Bitondi, M.M.G. Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: Cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 50, p. 68-81, 2014.

Ferraz, R.B.; Machado, A.M.; Navarro, J.C.; Cunha, I.; Ozorioa, R.; Salarod, A.L.; Castro, L.F.C. The fatty acid elongation genes *elov4a* and *elov4b* are present and functional in the genome of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 245, n. 110447, 2020.

Futahashi, R.; Yamahama, Y.; Kawaguchi, M.; Mori, N.; Ishii, D.; Okude, G. et al. Molecular basis of wax-based color change and UV reflection in dragonflies. **Elife**, v. 8, 2019.

Gaigg, B.; Toulmay, A.; Schneiter, R. Very long-chain fatty acid-containing lipids rather than sphingolipids per se are required for raft association and stable surface transport of newly synthesized plasma membrane ATPase in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34135-34145, 2006.

Gautam, S.G.; Opit, G.P.; Margosan, D.; Hoffmann, D.; Tebbets, J.S.; Walse, S. Comparative Egg Morphology and Chorionic Ultrastructure of Key Stored-Product Insect Pests, **Annals of the Entomological Society of America**, v. 108, n. 1, p. 43-56, 2015.

Ginzel, M.; Blomquist, G.J. Insect Hydrocarbons: Biochemistry and Chemical Ecology. In: Cohen, E.; Moussian, B. (Orgs), **Extracellular Composite Matrices in Arthropods**. 2016, Springer International Publishing, p. 221-252.

Good, N.E. The flour beetles of the genus *Tribolium*. **Technical Bulletin**, v. 498, p. 1186-1243, 1936.

Gordon, H.B.; Valdez, L.; Letsou, A. Etiology and treatment of adrenoleukodystrophy: new insights from *Drosophila*. **Disease Models Mechanisms**, v. 11, n. 6, 2018.

Grimaldi, D.; Engel, M.S. **Evolution of the insects**. Cambridge University Press, p. 755, 2005.

Gu, P.; Welch, W.H.; Guo, L.; Schegg, K.M.; Blomquist, G.J. Characterization of a Novel Microsomal Fatty Acid Synthetase (FAS) Compared to a Cytosolic FAS in the Housefly, *Musca domestica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118B, n. 2, p. 447–456, 1997.

Gullan, P.J.; Cranston, P.S. **Insetos: fundamentos da entomologia**, 6ª edição, Rio de Janeiro: Roca, 2021.

Gurská, D. **The changing roles of *Hox3* genes in insect evolution: characterizing the *zen* paralogues in the beetle *Tribolium castaneum***. 2017. Doktorgrades (Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät ) Universität zu Köln.

Handel, K.; Grünfelder, C.G.; Roth, S.; Sander, K. *Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. **Development Genes and Evolution**, v. 210, n. 4, p. 167-79, 2000.

Hartke, J.; Schell, T.; Jongepier, E.; Schmidt, H.; Sprenger, P.P.; Paule, J. *et al.* Hybrid Genome Assembly of a Neotropical Mutualistic Ant. **Genome Biology Evolution**, v. 11, n. 8, p. 2306-2311, 2019.

Hasan, M.A.; Ahmed, S.; Kim, Y. Biosynthetic pathway of arachidonic acid in *Spodoptera exigua* in response to bacterial challenge. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 111, 2019.

Hashimoto, K.; Yoshizawa, A.C.; Okuda, S.; Kuma, K.; Goto, S.; Kanehisa, M. The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n.1, p.183-191, 2008.

Haubruge, E.; Arnaud, L.; Mignon, J.; Gage, M.J.G. Fertilization by proxy: rival sperm removal and translocation in a beetle. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 266, p. 1183-1187, 1999.

Heming, B. **Insect development and evolution**. Ithaca, Cornell University Press, 2003.

Hernandez-Buquer, S.; Blacklock, B.J. Site-directed mutagenesis of a fatty acid elongase ELO-like condensing enzyme. **FEBS Letters**, v. 587, p. 3837-3842, 2013.

Horn, T.; Narov, K.D.; Panfilio, K.A. Persistent Parental RNAi in the Beetle *Tribolium castaneum* Involves Maternal Transmission of Long Double-Stranded RNA. **Advanced Genetics**, v. 3, n. 3, 2022.

Isokawa, M.; Sassa, T.; Hattori, S.; Miyakawa, T.; Kihara, A. Reduced chain length in myelin sphingolipids and poorer motor coordination in mice deficient in the fatty acid elongase Elovl1. **FASEB BioAdvances**, v. 1, n. 12, p. 747–759, 2019.

Jacobs, C.G.; Braak, N.; Lamers, G.E.; van der Zee, M. Elucidation of the serosal cuticle machinery in the beetle *Tribolium* by RNA sequencing and functional analysis of Knickkopf1, Retroactive and Laccase2. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 60, p. 7-12, 2015.

Jacobs, C.G.; van der ZEE, M. Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, p. 263-269, 2013.

Jacobs, C.G.C., Spink, H.P., van der Zee, M. The extraembryonic serosa is a frontier epithelium providing the insect egg with a full-range innate immune response. **Elife**, v. 3, 2014.

Jacobs, C.G.C.; Rezende, G.L.; Lamers, G.E.M.; van der Zee, M. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. **Proceedings Biological Science**, v. 280, p. 2013-1082, 2013.

Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jakobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 3, p. 237–249, 2006.

Jarrett, B.J.M.; Rebar, D.; Haynes, H.B.; Leaf, M.R.; Halliwell, C.; Kemp R. *et al.* Adaptive evolution of synchronous egg-hatching in compensation for the loss of parental care. *Proceedings Biological Sciences*, v. 285, n. 1885, 2018.

Jin, M.; Monroig, O.; Navarro, J.C.; Tocher, D.R.; Zhou, Q. Molecular and functional characterisation of two *elov4* elongases involved in the biosynthesis of very long-chain (> C24) polyunsaturated fatty acids in black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 212, 41–50, 2017.

Juárez, M.P.; Fernández, G.C. Cuticular hydrocarbons of triatomines. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 3, p. 711-730, 2007.

Jump, D.B. Mammalian fatty acid elongases. In: Ogorgozo, V.; Rockman, M.V. **Methods in Molecular Biology**, Cap. 16, p. 375-89, 2009

Jung, A.; Hollmann, M.; Schäfer, M.A. The fatty acid elongase NOA is necessary for viability and has a somatic role in *Drosophila* sperm development. **Journal of Cell Science**, v. 120, p. 2924–2934, 2007.

Kihara, A. Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. **Journal of Biochemistry**, v. 152, n. 5, p. 387-395, 2012.

Kinugasa, Y.; Hirano, Y.; Sawai, M.; Ohno, Y.; Shindo, T.; Asakawa, H. *et al.* The very-long-chain fatty acid elongase *Elo2* rescues lethal defects associated with loss of the nuclear barrier function in fission yeast cells. **Journal of Cell Science**, v.132, n. 10, jcs229021, 2019

Klingler, M.; Bucher, G. The red flour beetle *T. castaneum*: elaborate genetic toolkit and unbiased large scale RNAi screening to study insect biology and evolution. **EvoDevo**, v. 13, n. 14, p. 2-11, 2022.

Kniazeva, M.; Sieber, M.; McCauley, S.; Zhang, K.; Watts, J.L.; Han, M. Suppression of the ELO-2 FA elongation activity results in alterations of the fatty acid composition and multiple physiological defects, including abnormal ultradian rhythms, in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 159-169, 2003.

Kobayashi, Y.; Suzuki, H.; Ohba, N. Development of the pleuropodia in the embryo of the glowworm *Rhagophthalmus ohbai* (Rhagophthalmidae, Coleoptera, Insecta), with comments on their probable function. **Proceedings of Arthropodan Embryological Society of Japan**, v. 38, p. 19-26, 2003.

Koelzer, S.; Kölsch, Y.; Panfilio, K.A. Visualizing late insect embryogenesis: extraembryonic and mesodermal enhancer trap expression in the beetle *Tribolium castaneum*. **PloS One**, v. 9, n. 7, 2014.

Konopová, B.; Buchberger, E.; Crisp, A. Transcriptome of pleuropodia from locust embryos supports that these organs produce enzymes enabling the larva to hatch. **Frontiers in Zoology**, v. 17, n. 4, 2020.

Lambiase, S.; Grigolo, A.; Morbini, P. Ontogenesis of pleuropodia in different species of Blattaria (Insecta): a comparative study. **Italian Journal of Zoology**, v. 70, n. 3, p. 205-212, 2003.

Lamer, A.; Dorn, A. The serosa of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera): ontogeny, secretory activity, structural changes, and functional considerations. **Tissue Cell**, v. 33, p. 580–595, 2001.

Leonard, A.E. et al. Elongation of long-chain fatty acid. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 36-54, 2004.

Leonard, A.E.; Pereira, S.L.; Sprecher, H.; Huang, Y.-S. Elongation of long-chain fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 36–54, 2004.

Li, D.T.; Chen, X.; Wang, X.Q.; Moussian, B.; Zhang, C.X. The fatty acid elongase gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 108, p.32-43, 2019.

Li, L.; Gao, X.; Lan, M.; Yuan, Y.; Guo, Z.; Tang, P. *et al.* De novo transcriptome analysis and identification of genes associated with immunity, detoxification and energy metabolism from the fat body of the tephritid gall fly, *Procecidochares utilis*. **PLoS One**, v. 14, n. 12, e0226039, 2019.

Li, X.; Zhang, M.; Zhang, H. RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs. **PLoS One**, v. 6, n. 3, e17788, 2011.

Lin, W.S.; Yeh, S.R.; Fan, S.Z.; Chen, L.Y.; Yen, J.H.; Fu, T.F. *et al.* Insulin signaling in female *Drosophila* links diet and sexual attractiveness. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 7, p. 3870-3877, 2018.

Lockey, K.H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 89, n, 4, p. 595-645, 1988.

Lorini, I. Descrição, biologia e danos das principais pragas de grãos armazenados. In: Lorini, I., Miike, L.H., Scussel, V.M. (eds.). **Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Bio Geneziz, p. 378-397, 2002.

Louvet, J.P. Ultrastructure du pleuropode chez l'embryon du hanneton *Rhizotrogus majalis* Razoum (Coleoptera: Melolonthidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 12, p. 97–117, n. 2-3, 1983.

Lynch, M.; Force, A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. **Genetics**, v. 154, n. 1, p. 459-473, 2000.

McDonald, A.G.; Boyce, S.; Tipton, K.F. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 593-597, 2009.

McDonald, A.G.; Tipton, K.F. Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. **The FEBS Journal**, Online ahead of print. 2021.

Michener, C.D. **The bees of the world**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, p. 913, 2000.

Miller, S.C.; Brown, S.J.; Tomoyasu, Y. RNAi larval em *Drosophila*? **Development Genes and Evolution**, v. 218, p. 505-510, 2008.

Miller, S.C.; Miyata, K.; Brown, S.J.; Tomoyasu, Y. Dissecting Systemic RNA Interference in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*: Parameters Affecting the Efficiency of RNAi. **PLoS One**, v. 7, n. 10, 2012.

Moharana, K.C. **Polyploidization events shaped the transcription factor repertoires in legumes (Fabaceae)**. 2020. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia - Curso de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Monroig, Ó.; de Llanos, R.; Varó, I.; Hontoria, F.; Tocher, D.R.; Puig, S. Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in *Octopus vulgaris*: Molecular Cloning and Functional Characterisation of a Stearoyl-CoA Desaturase and an Elongation of Very Long-Chain Fatty Acid 4 Protein. **Marine Drugs**, v. 15, n. 3, p. 82, 2017.

Monroig, Ó.; Guinot, D.; Hontoria, F.; Tocher, D.R.; Navarro, J.C. Biosynthesis of essential fatty acids in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): Molecular cloning, functional characterisation and tissue distribution of a fatty acyl elongase. **Aquaculture**, v. 360-361, p. 45-53, 2012.

Monroig, Ó.; Rotllant, J.; Sánchez, E.; Cerdá-Reverter, J.M.; Tocher, D.R. Expression of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis genes during zebrafish *Danio rerio* early embryogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 11, p. 1093-10101, 2009.

Monroig, Ó.; Webb, K.; Ibarra-Castro, L.; Holt, G.J.; Tocher, D.R.; Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterization of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. **Aquaculture**, v. 312, p. 145-153, 2011.

Moriyama, M.; Numata, H. Induction of egg hatching by high humidity in the cicada *Cryptotympana facialis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 11-12, p. 1219-1225, 2006.

Ng, W.C.; Chin, J.S.R.; Tan, K.J.; Yew, J.Y. The fatty acid elongase Bond is essential for *Drosophila* sex pheromone synthesis and male fertility. **Nature Communications**, v. 6, n. 8263, 2015.

Nie, L.; Pascoa, T.C.; Pike, A.C.W.; Bushell, S.R.; Quigley, A.; RUDA, G.F. et al. The structural basis of fatty acid elongation by the ELOVL elongase. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 28, p. 512–520, 2021.

Nishide, Y.; Tanaka S.; Saeki, S. Adaptive difference in daily timing of hatch in two locust species, *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*: the effects of thermocycles and phase polyphenism. **Journal of Insect Physiology**, v. 72, p. 79-87, 2015.

Nunes da Fonseca, R.; von Levetzow, C.; Kalscheuer, P.; Basal, A.; van der Zee, M. Roth, S. Self-regulatory circuits in dorsoventral axis formation of the short-germ beetle *Tribolium castaneum*. **Developmental cell**, v. 14, n. 4, p. 605-615, 2008.

Nunes, F.M.F.; Simões, Z.L.P. Aplicações Biotecnológicas de RNAi em animais. In: Pereira, T.C. **Introdução à Técnica de Interferência por RNA - RNAi**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2013. Cap. 3, p. 25-36.

Oh, C.S.; Toke, A.; Mandala, S.; Martin, C.E. ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17376-173884, 1997.

Ohno, S. **Evolution by gene duplication**. 1970.

Palu, R. AS.; Chow, C.Y. Baldspot/*ELOVL6* is a conserved modifier of disease and the ER stress response. **PLoS Genetics**. v. 14, n. 8 e1007557, 2018.

Panfilio, K.A.; Oberhofer, G.; Roth, S. High plasticity in epithelial morphogenesis during insect dorsal closure. **Biology Open**, v, 2, n. 11, p. 1108-1118, 2013.

Parthasarathy, R.; Sheng, Z.; Sun, Z.; Palli, S.R. Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 40, n. 6, p. 429-39, 2010.

Parvy, J.P.; Napal, L.; Rubin, T.; Poidevin, M.; Perrin, L.; Wicker-Thomas, C. *Drosophila melanogaster* Acetyl-CoA-Carboxylase Sustains a Fatty Acid-Dependent Remote Signal to Waterproof the Respiratory System. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 8, e1002925, 2012.

Paul, S.; Gable, K.; Beaudoin, F.; Cahoon, E.; Jaworski, J.; Napier, J.A. *et al.* Members of the Arabidopsis FAE1-like 3-ketoacyl-CoA synthase gene family substitute for the Elop proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 14, p. 9018-9029, 2006.

Pauter, A.M.; Olsson, P.; Asadi, A.; Herslöf, B.; Csikasz, R.I.; Zdravec, D. *et al.* 2014. *Elov12* ablation demonstrates that systemic DHA is endogenously produced and is essential for lipid homeostasis in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 55, p. 718–728, 2014.

Pei, X.J.; Bai, T.T.; Zhang, Z.F.; Chen, N.; Li, S.; Fan, Y.L. *et al.* Two putative fatty acid synthetic genes of *BgFas3* and *BgElo1* are responsible for respiratory waterproofing in *Blattella germanica*. **Insect Science**, v. 29, n. 1, p. 33-50, 2022.

Pei, X.J.; Ean, Y.L.; Bai, Y.; Bai, T.T.; Schal, C.; Zhang, Z.F. *et al.* Modulation of fatty acid elongation in cockroaches sustains sexually dimorphic hydrocarbons and female attractiveness. **PLoS Biology**, v. 19, n. 7, e3001330, 2021.

Pérez-De La Fuente, R.; Engel, M.S.; Azar, D.; Peñalver, E. The hatching mechanism of 130-million-year-old insects: an association of neonates, egg shells and egg bursters in Lebanese amber. **Palaeontology**, v. 62, n. 4, p. 547–559, 2019.

Posnien, N.; Schinko, J.B.; Grossmann, D.; Shippy, T.D.; Konopova, B.; Bucher, G. RNAi in the Red Flour Beetle (*Tribolium*). **Cold Spring Harbor Protocols**, 2009.

Prasitchoke, P.; Kaneki, Y.; Sugiyama, M.; Bamba, T.; Fukusaki, E.; Kobayashi, A. *et al.* Functional analysis of very long-chain fatty acid elongase gene, *HpELO2*, in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 76, p. 417-427, 2007b.

Prasitchoke, P.; Kaneko, Y.; Bamba, T.; Fukusaki, E.; Kobayashi, A.; Harashima, S. Identification and characterization of a verylong-chain fatty acid elongase gene in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. **Gene**, v. 391, p.16–25, 2007a.

Prpic, N.M.; Wigand, B.; Damen, W.G.; Klingler, M. Expression of dachshund in wild-type and Distal-less mutant *Tribolium* corroborates serial homologies in insect appendages. **Development Genes and Evolution**, v. 211, n. 10, p. 467-77, 2001.

Raikhel, A. S.; Dhadialla, T. S. Accumulation of yolk proteins in insects oocytes. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 217-251, 1992.

Reynolds, J.A.; Poelchau, F.; Rahman, Z.; Armbruster, P.A.; Denlinger, D.L. Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 7, p. 966-973, 2012.

Rezende, G.L.; Vargas, H.C.M.; Moussian, B.; Cohen, E. Composite Eggshell Matrices: Chorionic Layers and Sub-chorionic Cuticular Envelopes, in: **Extracellular Composite Matrices in Arthropods**. Springer International Publishing, p. 325-366, 2016.

Rost, M.M.; Poprawa, I.; Klag, J. Ultrastructure of the pleuropodium in 8-d-old embryos of *Thermobia domestica* (Packard) (Insecta, Zygentoma). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 3, p. 541–547, 2004.

Sarrazim, A.F.; Peel, A.D.; Averof, M. A Segmentation Clock with Two-Segment Periodicity in Insects. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 338-341, 2012.



Sassa, T.; Kihara, A. Metabolism of very long-chain Fatty acids: genes and pathophysiology. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 83-92, 2014.

Senyilmaz, D.; Virtue, S.; Xu, X.; Tan, C.Y.; Griffin, J.L.; Miller, A.K.; Puig, A.V. *et al.* Regulation of mitochondrial morphology and function by Stearoylation of TfR1. **Nature**, v. 525, n. 7567, p. 124-128, 2015.

Shirai, Y., Piulachs, M.D., Belles, X., Daimon, T. DIPA-CRISPR is a simple and accessible method for insect gene editing. **Cell Reports Methods** 2. v, 2, n. 5, 2022.

Sikes, E.K.; Wigglesworth, V.B. Memoirs: The hatching of insects from the egg, and the appearance of air in the tracheal system. **Journal of Cell Science**, v. 4, n. 294, p. 165–192, 1931.

Slifer, E.H. The formation and structure of a special water absorbing area in the membranes covering the grasshopper egg. **Journal of Cell Science**, v. 80, p. 437-57, 1938.

Slifer, E.H. The origin and fate of the membranes surrounding the grasshopper egg; together with some experiments on the source of the hatching enzyme. **Journal of Cell Science**, v. 79, n. 315, p. 493-506, 1937.

Sokoloff, A. Sex and crossing over in *Tribolium castaneum*. **Genetics**, v, 50, p. 491-496, 1964.

South, A.; Sirot; L.K.; Lewis, S.M. Identificação de proteínas do fluido seminal previstas em *Tribolium castaneum*. **Biologia molecular de insetos**, v. 20, n. 4, p. 447-456, 2011.

Stay, B. Fine structure of two types of pleuropodia in *Diploptera punctata* (Dictyoptera: Blaberidae) with observations on their permeability. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 6, n. 2, p. 67-95, 1977.

Szafer-Glusman, E.; Giansanti, M.G.; Nishihama, R.; Bolival, B.; Pringle, J. Gatti, M. *et al.* A Role for Very-Long-Chain Fatty Acids in Furrow Ingression during Cytokinesis in *Drosophila* Spermatocytes. **Current Biology**, v. 18, p. 1426-1431, 2008.

Tamura, K.; Makino, A.; Hullin-Matsuda, F.; Kobayashi, T.; FUrihata, M.; Chung, S. *et al.* Novel Lipogenic Enzyme *ELOVL7* Is Involved in Prostate Cancer Growth through Saturated Long-Chain Fatty Acid Metabolism. **Cancer Research**, v. 69, n. 20, p. 8133–8140, 2009.

Terenius, O.; Papanicolaou, A.; Garbutt, J.S.; Eleftherianos, I.; Huvenne, H.; Kanginakudru, S. *et al.* RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal Insect Physiology**, v. 57, n. 2, p. 231-45, 2011.

Viscuso, R. Sottile, L. Fine structure of pleuropodia in three species of Insecta Orthoptera during embryonic development. **Italian Journal of Zoology**, v. 75, n. 1, p. 11–19, 2008.

Wakil, S.J.; Stoops, J.K.; Joshi, V.C. Fatty Acid Synthesis and its Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 537-579, 1983.

Wallis, J.G.; Watts, J.L.; Browse, J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? **Trends in Biochemical Science**, v. 27, n. 9, p. 467, 2002.

Walski, T.; Van Damme, E.J.M.; Smargiasso, N.; Christiaens, O.; De Pauw, E.; Smagge, G. Protein N-glycosylation and N-glycan trimming are required for postembryonic development of the pest beetle *Tribolium castaneum*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 35151, 2016.

Welihinda, A.A.; Tirasophon, W.; Kaufman, R.J. The Cellular Response to Protein Misfolding in the Endoplasmic Reticulum. **Gene expression**. v. 7, n. 4-6, p. 293-300, 1999.

Westerberg, R.; Månsson, J.E.; Golozoubova, V.; Shabalina, I.G.; Backlund, E.C.; Tvrdik, P. *et al.* **ELOVL3** Is an Important Component for Early Onset of Lipid Recruitment in Brown Adipose Tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 4958-4968, 2006.

Woods, H.A.; Bonnecaze, R.T.; Zrubek, B. Oxygen and water flux across eggshells of *Manduca sexta*. **Journal Experimental Biology**, v. 208, n. 7, p. 1297-308, 2005.

Xiang, M.; Zhang, H.Z.; Jing, X.Y.; Wang, M.Q.; Mao, J.J.; LI, Y.Y. *et al.* Sequencing, Expression, and Functional Analyses of Four Genes Related to Fatty Acid Biosynthesis During the Diapause Process in the Female Ladybird, *Coccinella septempunctata* L. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. 706032, 2021.

Yan, G, Y.; Zhao, X.; Niu, N.; Zhao, Y.; Liu, W.; Moussian, B.; Zhang, J. Two fatty acid synthase genes from the integument contribute to cuticular hydrocarbon biosynthesis and cuticle permeability in *Locusta migratoria*. **Insect Molecular Biology**, v. 29, n. 6, p. 555-568, 2020.

Yoon, D.S.; Byeon, E.; Kim, D.H.; Lee, Y.; Choi, H.; Park, H.G. *et al.* Genome-wide identification of fatty acid synthesis genes, fatty acid profiles, and life parameters in two freshwater water flea *Daphnia magna* strains, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 262, n.110774, 2022,

Young, A.R.; Mancuso, N.; Bowles, V.M. Biochemical aspects of egg hatch in endo- and ectoparasites: potential for rational drug design. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 861-867, 1999.

Young, A.R.; Mancuso, N.; Meeusen, E.N.; Bowles, V.M. Characterisation of proteases involved in egg hatching of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 925-932, 2000.

Zeh, D.W.; Zeh, J.A.; Smith, R.L. Ovipositors, amnions and eggshell Architecture in the diversification of terrestrial arthropods. **The Quarterly Review of Biology**, v. 64, p. 147-168, 1989.

Zhang, K.; KniazevA, M.; Han, M.; Li, W.; Yu, Z.; Yang, Z. *et al.* A 5-bp deletion in *ELOVL4* is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 89-93, 2001.

Zhang, Z.Q. Animal biodiversity: An introduction to higher-level classification and taxonomic richness. **Zootaxa**, v. 3148, p.7-12, 2011.

Zhao, X.; Yang, Y.; Niu, N.; Zhao, Y.; Liu, W.; Ma, E. *et al.* The fatty acid elongase gene *LmELO7* is required for hydrocarbon biosynthesis and cuticle permeability in the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Journal of Insect Physiology**, v. 123, 2020.

Zheng, T.; Li, H.; Han, N.; Wang, S.; Price, H.J.; Wang, M. *et al.* Functional Characterization of Two Elongases of Very Long-Chain Fatty Acid from *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10990, 2017.

Zhu, Q.; Arakane, Y.; Beeman, R.W.; Kramer, K.J. Muthukrishnan S. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 18, p. 6650-6655, 2008.

Zuo, W.; Li, C.; Liu, Y.; Gao, R.; Luan, Y.; Zhang, B. *et al.* Bmelo12, an elongase of very long-chain fatty acids gene, regulates silk yield in *Bombyx mori*. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 49, n. 9, p. 909-911, 2022.

Zuo, W.; Li, C.; Luan, Y.; ZhaNG, H.; Tong, X.; Han, M. *et al.* Genome-wide identification and analysis of elongase of very long chain fatty acid genes in the silkworm, *Bombyx mori*. **Genome**, v. 61, n. 3, p. 167-176, 2018.

## ANEXO I

### **Script para quatro *motifs* que contém resíduos de aminoácidos importantes para a atividade catalítica das elongases**

```
#!/usr/bin/perl

use strict;
use warnings;

#enter the motif condition here:
my $x= '[ARNDCSEQHILKMFPSTWYV]';
my $h= '[KR]';
my $i= '[DE]';
my $j= '[NT]';
my $k= '[YF]';
my $l= '[YVILF]';

#MOTIFS:
my $motif = "($h)($x){5}($i)"; #motif to be searched is KouRxxxxxDouE
my $motif2 = "HH"; #motif to be searched is HH
my $motif3 = "($j)($x){3}H"; #motif to be searched is NouTxxxH
my $motif4 = "($k)($x)($l)($l)"; #motif to be searched is "YouF x YouVouIouLouF YouVouIouLouF"

#enter the query sequence here:
print STDOUT "Enter the multi-fasta file: ";
my $seqfile = <STDIN>;
chomp $seqfile;

#Query sequences WITH motifs
my %seqs = %{ read_fasta_as_hash( $seqfile ) };

my $outfile= "ELOV-seq_with_ALL_motifs.txt";
open (OUTFILE, ">> $outfile") || die "ERROR: opening $outfile\n";

foreach my $id ( keys %seqs ) {
    if ( $seqs{$id} =~ /$motif/ ) {
        if ( $seqs{$id} =~ /$motif2/ ) {
            if ( $seqs{$id} =~ /$motif3/ ) {
                if ( $seqs{$id} =~ /$motif4/ ) {
                    print OUTFILE "$id\n";
                }
            }
        }
    }
}
```

```

        print OUTFILE "$seqs{$id}\n";
    }
}
}
}
}
close OUTFILE;

#Query sequences WITHOUT motifs
my %seqs = %{ read_fasta_as_hash( $seqfile ) };

#Query sequences WITHOUT KouRxxxxxDouE
my $outfile2= "seq_without_KouRxxxxxDouE.fasta";
open (OUTFILE, ">> $outfile2") || die "ERROR: opening $outfile2\n";

foreach my $id ( keys %seqs ) {
    if ( $seqs{$id} !~ /$motif/ ) {
        print OUTFILE "$id\n";
        print OUTFILE "$seqs{$id}\n";
    }
}
close OUTFILE;

#Query sequences WITHOUT HH
my $outfile3= "seq_without_HH.fasta";
open (OUTFILE, ">> $outfile3") || die "ERROR: opening $outfile3\n";

foreach my $id ( keys %seqs ) {
    if ( $seqs{$id} !~ /$motif2/ ) {
        print OUTFILE "$id\n";
        print OUTFILE "$seqs{$id}\n";
    }
}
close OUTFILE;

#Query sequences WITHOUT NouTxxxH
my $outfile4= "seq_without_NouTxxxH.fasta";
open (OUTFILE, ">> $outfile4") || die "ERROR: opening $outfile4\n";

```

```

foreach my $id ( keys %seqs ) {
    if ( $seqs{$id} !~ /$motif3/ ) {
        print OUTFILE "$id\n";
        print OUTFILE "$seqs{$id}\n";
    }
}
close OUTFILE;

#Query sequences WITHOUT YouFxYouVouIouLouFYouVouIouLouF
my $outfile5= "seq_without_YouFxYouVouIouLouFYouVouIouLouF.fasta";
open (OUTFILE, ">> $outfile5") || die "ERROR: opening $outfile5\n";

foreach my $id ( keys %seqs ) {
    if ( $seqs{$id} !~ /$motif4/ ) {
        print OUTFILE "$id\n";
        print OUTFILE "$seqs{$id}\n";
    }
}
close OUTFILE;

sub read_fasta_as_hash {
    my $fn = shift;

    my $current_id = '';
    my %seqs;
    open FILE, "<$fn" or die $!;
    while ( my $line = <FILE> ) {
        chomp $line;
        if ( $line =~ /^(>.*)$/ ) {
            $current_id = $1;
        } elsif ( $line !~ /\s*$/ ) { # skip blank lines
            $seqs{$current_id} .= $line
        }
    }
    close FILE or die $!;
    return \%seqs;
}

```

## ANEXO II

### Protocolo de hibridização *in situ* colorimétrica de embriões de *Tribolium castaneum* em estágio inicial (até ~20 h de idade)

#### Notas:

- a. Versão 3.1, março de 2023, feito por Gustavo Rezende a partir do protocolo feito na University of Warwick, lab de Kristen Panfilio, baseado nos protocolos de Dave Kosman, Klingler lab, Rodrigo Nunes da Fonseca e contribuições pessoais de Fabian Pridöhl, Kristen Panfilio e Ulli Oliveira.
- b. São empregados ovos que foram previamente fixados, tiveram sua casca removida e que estão armazenados a -20 °C em metanol.
- c. Todos os procedimentos serão realizados em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL com 30 - 60 µL de ovos depositados no fundo. Cada tubo é uma condição; se 1 gene for testado, serão 2 tubos (um tubo com sonda *antisense* e outro tubo com sonda *sense*).
- d. Na etapa 6, o volume de 3 µL da sonda de *in situ* pode variar, dependendo do resultado encontrado na primeira vez que se testa uma sonda nova.
- e. **Enxaguar (*rinse*):** remover o sobrenadante, adicionar 1 mL de solução fresca, deixar os ovos decantarem, remover o sobrenadante.  
**Lavar (*wash*):** remover o sobrenadante, adicionar 1 mL de solução fresca, inverter ou balançar o tubo pelo tempo indicado. Deixar os ovos decantarem, inverter o tubo rapidamente para jogar para baixo os ovos que grudarem nas paredes ou na tampa.  
**RT:** temperatura ambiente (*room temperature*).
- f. O sobrenadante deve ser removido com pipeta automática ou pipeta Pasteur de vidro.
- g. Esse é um protocolo de 03 dias. Recomenda-se checar a existência de todos os reagentes e soluções antes de se iniciar.

#### Reagentes necessários:

- 1) anti-DIG-AP (anticorpo para Digoxigenina ligado a enzima *Alkaline Phosphatase*; Roche/Sigma 11093274910, Anti-DIG-AP Fab fragments)
- 2) Etanol (Merck/Sigma EMSURE # 1.00983)
- 3) Formamida (Sigma F7508)
- 4) Heparina (Sigma H3393 - 10KU; Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa) ou Heparina Sódica (Cristália, Hemofol; 5.000 UI/mL; "50 mg/mL")
- 5) Metanol (Merck/Sigma 34885)      6) MgCl<sub>2</sub> 1M      7) NaCl 1M ou 5M

- 8) NBT/BCIP stock solution (Roche/Sigma 11681451001)
- 9) PBS 1x pH 7,2 (LGC Biotecnologia 13-30259-05)
- 10) Salmon Sperm DNA (Roche/Sigma DNA, MB-grade from fish sperm 11467140001)
- 11) SSC 20x
- 12) Tris-HCl pH 9,5 1M
- 13) Tween-20 (Pharmacia Biotech, PlusOne 17-1316-01)
- 14) VectaShield com DAPI (Vector Laboratories, H-1200-10)
- 15) Western Blocking Reagent, Solution - WBS (Roche/Sigma 11921673001)\*

\*o protocolo original que usei em Warwick era com Bovine Serum Albumin - BSA (Sigma A7906; heat shock fraction, pH 7, ≥98%) e Normal Goat Serum - NGS, que eu nunca soube com certeza o número de catálogo (seria o Sigma G9023? Não sei...) e nem a concentração.

### **Receitas (todas as concentrações mostradas são as concentrações finais):**

**PBT:** 1x PBS, 0,1% Tween-20.

**Hyb Sol I:** 50% Formamida, 5x SSC, 50 µg/mL Heparina. Ajustar o pH para 5,5 com HCl concentrado, checar com fita de pH.

**Hyb Sol II:** Hyb Sol I com 100 µg/mL Salmon sperm DNA.

**Block Solution\*:** 275 uL Western blocking reagent (WBS) + 725 uL PBT / 1 mL

**Tampão Alcalino:** 100mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0,2% Tween-20.

**Solução de Marcação com NBT/BCIP:** 20 uL NBT/BCIP stock solution + 1 mL Tampão Alcalino (*i.e.* diluir 50 vezes o NBT/BCIP stock solution em Tampão Alcalino).

\*o protocolo original que usei em Warwick empregava uma Block Solution com: 10 mg/mL BSA + 1,8 mg/mL (??) NGS, feito em PBT (eu nunca descobri a concentração do NGS).

### **Dia 01: Hibridização dos embriões com sonda**

Soluções a serem utilizadas no Dia 01:

**PBT:** 6 mL por tubo. O que sobrar pode ser utilizado no Dia 02.

**Hyb Sol I:** 11 mL por tubo nos Dia 01 e 02 (preparar o volume total para os dois dias).

**Hyb Sol II** (feita a partir da Hyb Sol I): 1,2 mL por tubo.

Etapas:



1. Enxaguar os ovos em 30% PBT em metanol, depois em 70% PBT em metanol, depois 100% PBT.
  2. Lavar os ovos 3 vezes em PBT, 5 minutos cada lavagem, a temperatura ambiente (RT) no balançador (*rocker*) orbital.
  3. Lavar os ovos em 50% PBT com 50% Hyb Solution I por 10 min at RT no balançador orbital.
  4. Lavar os ovos em Hyb Solution I pura por 10 min a RT no balançador orbital. Após esse período, remova o sobrenadante.
  5. Incubar os ovos em Hyb Solution II por 1 hora a **55 °C** (idealmente em um banho seco com agitação). Utilizamos o equipamento do Jorge na sala de Biomol do LQFPP.
  6. Para cada tubo, preparar 150 µL de Hyb Solution II contendo 3 µL da sonda de *in situ* desejada. Aquecer a **80 °C** no termociclador por 3 min (para desnaturar qualquer estrutura secundária de RNA) e mantenha a 55 °C até ser utilizado na Etapa 7. O volume da sonda pode ser ajustado, em futuros experimentos, se o sinal for muito fraco ou muito forte (faixa de volume sugerida entre 1,5 - 6 µL).
  7. Remover a Hyb Solution II e adicionar os 150 µL de Hyb Solution II com a sonda. Incubar *overnight* (o.n.) a **55 °C**. Idealmente em um banho seco com agitação, mas os tubos podem ficar o.n. sem se mexer. Em qualquer caso, é bom ressuspender os ovos gentilmente com uma P200 duas vezes antes do período o.n. e mais duas vezes na manhã seguinte.
- Tempo estimado (para 4 tubos): ~ 2 horas e 30 minutos. Para terminar as 18:00 deveria-se iniciar por volta das 14:00.

## **Dia 02: Lavagens e incubação com anticorpo anti-DIG-AP**

### Soluções a serem utilizadas no Dia 02:

**PBT:** 6,5 mL por tubo, mais ~ 4 mL para a Etapa 14 independente do número de tubos.

**Hyb Sol I:** Já foi preparado no dia anterior.

**Blocking Solution:** 2 mL por tubo, mais 5 mL para a Etapa 14 independente do número de tubos.

### Etapas:

8. Lavar 3 vezes, 5 minutos cada com Hyb Solution I a **55 °C** no banho seco com agitação.
9. Lavar 4 vezes, 30 min cada com Hyb Solution I a **55 °C** no banho seco com agitação.

10. Lavar uma vez, 10 min em solução 2:1 (2 Hyb Sol I : 1 PBT) a **55 °C** no banho seco com agitação.
11. Lavar uma vez, 10 min em solução 1:2 (1 Hyb Sol I : 2 PBT) a **55 °C** no banho seco com agitação.
12. Lavar 4 vezes, 10 min cada em PBT, RT no balançador orbital.
13. Lavar 2 vezes, 30 min cada em Block Solution, RT no balançador orbital.
14. Diluir o anticorpo anti-DIG-AP em Block Solution fresca, 1:5000 (i.e. 1 µL de anti-DIG-AP em 5 mL de Block Solution).
15. Incubar com 1 mL de Block Solution com o anticorpo *o.n.* a **4 °C** no balançador orbital dentro da geladeira.

### **Dia 03: Lavagens e revelação colorimétrica**

#### Soluções a serem utilizadas no Dia 03:

**PBT:** 17 mL por tubo.

**Tampão Alcalino:** 3 mL por tubo.

**Etanol 50%:** 2 mL por tubo.

**Etanol 75%:** 1 mL por tubo

**Etanol 25%:** 1 mL por tubo.

**Vectashield com DAPI 50%:** 75 µL por tubo.

16. Lavar 3 vezes, 5 min cada com PBT a RT no balançador orbital.
17. Lavar 3 vezes, 15 min cada com PBT, RT no balançador orbital.
18. Lavar 2 vezes, 5 min cada, com Tampão Alcalino no balançador orbital.
19. Colocar os embriões na Solução de Marcação com NBT/BCIP feita em Tampão Alcalino. Transferir os embriões do tubo Eppendorf para um vidro relógio. Manter os ovos no escuro enquanto a coloração de desenvolve. O tempo que leva para o padrão de coloração aparecer varia entre sondas e entre genes. A coloração pode começar a aparecer em 10 ou 15 min (o que geralmente indica um excesso de sonda na Etapa 6) ou após 1 ou 2 horas ou até mesmo mais horas. Caso não apareça coloração depois de algumas horas, os ovos podem ser retornados ao tubo eppendorf e armazenados *o.n.* a 4 °C, para se avaliar o desenvolvimento da cor no dia seguinte. De forma geral, melhor esperar muitas horas do que poucos minutos para a coloração surgir.

As etapas 20 a 26 são realizadas a RT no balançador orbital

20. Quando um padrão específico de coloração for obtido, lavar os ovos 6 vezes com PBT, por 5 minutos cada, a RT.

21. Lavar os ovos em 50% Etanol em PBT por 5 min.
22. Lavar os ovos em 75% Etanol em PBT por 5 min.
23. Lavar os ovos em 100% Etanol por no máximo 10 min.
24. Lavar os ovos em 50% Etanol em PBT por 5 min.
25. Lavar os ovos em 25% Etanol em PBT por 5 min.
26. Lavar os ovos 3 vezes em PBT por 5 min cada.
27. Colocar os ovos em 75  $\mu$ L de solução de 50% Vectashield com DAPI em PBS 1x (**não é PBT**), ou seja, 37,5  $\mu$ L Vectashield + 37,5  $\mu$ L PBS 1x.
28. Guardar os ovos em 50% Vectashield com DAPI na geladeira, até a visualização no microscópio da *in situ* colorimétrica com campo claro ou DIC e dos núcleos celulares no canal UV (DAPI). Os ovos podem ser assim mantidos na geladeira por alguns dias, semanas ou meses.

12 de março de 2023.