

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES *elov1* NA  
Serosa de *Tribolium castaneum* (COLEOPTERA:  
TENEBRIONIDAE)

**HELENA CAROLINA MARTINS VARGAS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
ABRIL - 2015

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES *elov1* NA  
Serosa de *Tribolium castaneum* (COLEOPTERA:  
TENEBRIONIDAE)

**HELENA CAROLINA MARTINS VARGAS**

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

Orientador: Prof. Gustavo Lazzaro Rezende

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
ABRIL – 2015

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES *elov1* NA  
Serosa de *Tribolium castaneum* (COLEOPTERA:  
TENEBRIONIDAE)

**HELENA CAROLINA MARTINS VARGAS**

“Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências necessárias para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia (Biologia Celular).”

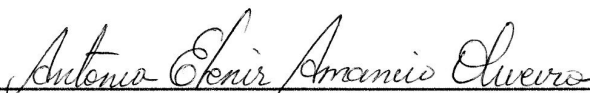
Aprovada em: 02 de Abril de 2015

Comissão Examinadora:



---

Dr<sup>a</sup>. Rafaela Vieira Bruno – IOC/Fiocruz



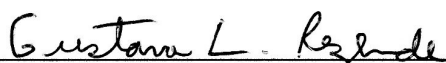
---

Dr<sup>a</sup>. Antônia Elenir Amâncio Oliveira – CBB-UENF



---

Dr. Thiago Motta Venancio – CBB-UENF



---

Dr. Gustavo Lazzaro Rezende – CBB-UENF  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico à minha mãe, Maria Helena, por ter aceitado o desafio de ser mãe e sempre ter me apoiado. Sem você nada disso seria possível.**

**“Você é o único representante do seu sonho na face da Terra. Se isso não fizer você correr eu não sei o que vai”**

**Emicida**

## **AGRADECIMENTOS**

Às leis que regem a vida. Obrigada por essa passagem de muitos desafios e aprendizados.

Aos meus pais, Maria Helena e Gilmar, por todo o apoio e dedicação. Muito obrigada por terem investido na minha educação mesmo nos momentos mais difíceis e por nunca me deixarem desistir. Cada etapa concluída é por vocês.

À minha família Martins por sempre estar ao meu lado mostrando o verdadeiro significado de família. Somos um só, pra sempre!

À todos os professores que passaram na minha vida e me mostraram a beleza da profissão. Em especial ao professor Luís Fernando Dorvillé Marques (UERJ) por ser um excelente professor, que sempre ministrou suas aulas com brilho nos olhos e me apresentou o mundo mágico da Entomologia. Foi um prazer ser sua aluna.

Aos meus grandes amigos, Nathalia Faustino, Camilla Rodrigues, Felipe Steinhagem e Mariana Pimenta por nunca terem se afastado apesar da distância. Espero que possamos sempre conversar como se nunca tivéssemos nos separado. Amo vocês.

À Loise Lopes, Ojana Bravin e Rafaela Screnci-Ribeiro por terem me acolhido em Campos e tornado minha vida mais leve sempre me dando suporte nos momentos em que fraquejei. Tudo isso à base de muitas risadas e Nutella. Que nossa amizade perpetue por longos anos.

À Luan Cordeiro por ter me recebido de braços abertos em Campos e por ser um ótimo amigo.

À Lupis Ribeiro por ser uma pessoa simples e boa de coração. Por ser um bom companheiro dentro e principalmente fora do ambiente de trabalho. Muito obrigada pelos bons momentos e por sempre estar disposto a me ajudar. Foi muito bom caminhar ao seu lado e sempre aprender que são as adversidades que nos fazem mais fortes. Valeu, Best!!!

À Lorena Lima, Josiana Andrade e Letícia Oliveira por todos os encontros divertidos. Muito obrigada por terem me adotado nessa nova cidade. O que seria de mim sem as nossas farras gastronômicas?

Aos professores Jorge Hernandez (UENF), Antônia Elenir Amâncio (UENF) e Rodrigo Fonseca (UFRJ) pelo suporte dado para a execução de boa parte dos experimentos dessa dissertação.

A todos os amigos do LQFPP que fazem do departamento um ambiente de trabalho extremamente agradável. Em especial a dona Isabela e a seu Cristovão, por serem sempre gentis e solícitos.

Ao prof Renato Da Matta e ao M.Sc. Gabriel Rabelo por cederem seu laboratório e equipamentos para a execução dos experimentos.

Ao LFBM por ceder seu espaço e equipamentos para a realização de boa parte dos experimentos dessa dissertação.

A Dr<sup>a</sup>. Rafaela Bruno e a todos os integrantes do seu laboratório, em especial ao Robão, por sempre terem colaborado para a execução deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Denise Valle por ter aceitado a árdua tarefa de ser revisora deste trabalho e também pela oportunidade que me deu há mais de 5 anos para que eu inicia-se na carreira científica. Por ser uma fonte de inspiração e garra. Você é um ser único e nunca esquecerei o que você fez por mim. OBRIGADA POR TUDO.

À Dr<sup>a</sup> Luana Farnesi por ter me inserido nesta linha de pesquisa que amo. Por todos os ensinamentos sobre ciência e vida e por sempre acreditar em mim. Você sempre será minha orientadora não importa quanto tempo passe. Agradeço todos os dias por ter tido a sorte de ter você na minha vida. Meu orgulho.

Ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da UENF e a todos os seus professores.

Ao prof. Jorge Nessimian e ao programa de Pós-graduação em Zoologia da UFRJ.

As agências financiadoras do projeto: CAPES, CNPq e FAPERJ.

E por ultimo, mas não menos importante. Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Orientador, lutador de Kung-Fu e baterista Gustavo Lazzaro Rezende, ou simplesmente Gu, pela paciência. A conclusão desta dissertação não seria possível sem toda a sua paciência para entender meus momentos de fraqueza. Obrigada por me ajudar a vencer minhas limitações e sempre me dar força para ir adiante. Agradeço também por todos os leves puxões de orelha e

também pelos infinitos papos sobre música, filmes e vida. Você é um super orientador e uma pessoa muito boa de coração. Obrigada pela oportunidade e por não ter desistido de mim... É um privilégio conviver e aprender com você.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT .....	XVI
<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 – A CLASSE INSECTA E SUA RELEVÂNCIA.....	17
1.2 – O BESOIRO <i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i> .....	19
1.3 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE <i>T. CASTANEUM</i> .....	21
1.4 – O PAPEL DAS MEMBRANAS EXTRA-EMBRIONÁRIAS DURANTE A EMBRIOGÊNESE DE INSETOS.....	24
1.5 – A CUTÍCULA SEROSA E A RESISTÊNCIA DOS OVOS À DESSECAÇÃO.....	25
1.6 – A FAMÍLIA DOS GENES <i>ELONGASE (ELOVL)</i> E SEU PAPEL NA IMPERMEABILIZAÇÃO .....	27
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE <i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i> .....	30
3.2 OBTENÇÃO DE OVOS .....	30
3.3 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA .....	31
3.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE RT-PCR.....	32
3.5 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS .....	35
3.6 FIXAÇÃO DOS OVOS.....	35
3.7 PREPARO DE SONDAS DE RNA MARCADAS COM DIG.....	36
3.8 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> DO OVOS .....	36
3.9 MARCAÇÃO NUCLEAR COM DAPI E VISUALIZAÇÃO NO MICROSCÓPIO .....	37
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 O GENOMA DE <i>T. CASTANEUM</i> POSSUI 18 PARÁLOGOS DE GENES <i>ELOVL</i> .....	38
4.2. INFERÊNCIAS A PARTIR DO TILING ARRAY APONTAM QUE OS GENES <i>Tc-ELOVL01</i> , <i>Tc-ELOVL02</i> , <i>Tc-ELOVL03</i> E <i>Tc-ELOVL04</i> PODEM SER EXPRESSOS NA SEROSA .....	42
4.3 OS GENES <i>Tc-ELOVL01</i> , <i>Tc-ELOVL02</i> , <i>Tc-ELOVL03</i> E <i>Tc-ELOVL04</i> SÃO EXPRESSOS NA EMBRIOGÊNESE INICIAL.....	46
4.4. TODOS OS AMPLICONS OBTIDOS CORRESPONDEM AOS GENES ESPERADOS .....	47
4.5 OS GENES <i>Tc-ELOVL01</i> , <i>Tc-ELOVL02</i> , <i>Tc-ELOVL03</i> E <i>Tc-ELOVL04</i> , MAS NÃO O GENE <i>Tc-ELOVL07</i> , SÃO EXPRESSOS NA SEROSA .....	57
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema da estrutura corpórea de um inseto adulto. Vista lateral do corpo de um gafanhoto (Orthoptera). Adaptado de [<http://www.fao.org/>]. ..... 17
- Figura 2: Esquema dos estágios de desenvolvimento de insetos ametábolos, hemimetábolos e holometábolos. A: Desenvolvimento ametábolo de Apterygota. B: Desenvolvimento hemimetábolo de Hemiptera. C: Desenvolvimento holometábolo de Coleoptera. Adaptado de [<http://bjresumos.blogspot.com.br/>], Ruppert & Barnes 1996. .... 18
- Figura 3: Estágios de vida do besouro *T. castaneum*. A: ovo; B: larva; C: pupa e D: adulto. Os painéis não estão na mesma escala. Adaptado de: A: Rezende 2008, B e C: [<http://entomovores.ze-forum.com/>], D: [<http://agrolink.com>]. ..... 20
- Figura 4: Esquema do início do desenvolvimento embrionário de insetos. A: ovócito fertilizado. B: Divisão mitótica dos energídeos. C: Migração dos energídeos para região periférica e início da formação das células polares. D: Formação do blastoderma sincicial e definição das células polares. bs: blastoderma sincicial, cp: células polares, en: energídeo, nf: núcleo feminino, np: núcleos polares, sptz: espermatozóide, v: vitelófago. Adaptado de Klowden (2007) a partir de Johansen & Butt (1941)..... 22
- Figura 5: Esquema da diferenciação do blastoderma celular, definição das membranas extraembrionárias e início da gastrulação em embrião de *T. castaneum* mantido a 30 °C. **A-D**: Marcação nuclear com DAPI. **A'-D'**: Esquema representativo dos diferentes tipos celulares presentes em A-D. Verde escuro: blastoderma celular indiferenciado, vermelho: serosa, azul: âmnio, verde claro: embrião. **A, A'**: Blastoderma celular indiferenciado. **B, B'**: Blastoderma celular diferenciado e início da gastrulação. **C, C'**: Âmnio e banda germinal invaginam-se e a serosa começa a circundá-los. **D, D'**: Serosa engloba âmnio e a banda germinal. A banda germinal inicia o processo de extensão. As células da serosa são polipóides e maiores que aquelas do âmnio e do embrião, estas diplóides. ca: cavidade amniótica, daa: dobra amniótica anterior, dap, dobra amniótica posterior, js: janela da serosa, o asterisco indica a região do poço primitivo. Região anterior está voltada para a esquerda e a região dorsal para cima. Embrião A com 8 horas de desenvolvimento embrionário. Embriões de B-D entre 10 e 14 horas de desenvolvimento embrionário. Esquemas A'-D' baseados em Rafiqi *et al.* (2008). Imagem A retirada de Menezes 2014; **C**: adaptada de Rezende 2008; **B e D**: Helena Vargas..... 23
- Figura 6: Esquema de embrião de insetos 'banda curta' e 'banda longa'. A: Esquema de embrião banda curta, comum em grande parte dos insetos. Os embriões ocupam apenas uma pequena porção dentro do ovo no início da gastrulação. B: Esquema de embrião banda longa, comum para Diptera superiores, Lepidoptera e Hymenoptera. Neste caso os embriões ocupam maior espaço dentro do ovo no início da gastrulação. Adaptado de Kimelman & Martin 2012. 24
- Figura 7: Esquema do processo de formação da cutícula serosa em embrião de *Aedes aegypti*. A cutícula serosa (em cinza) é sintetizada pelas células da serosa (em vermelho). Adaptado de Rezende *et al.* (2008). Após a formação da cutícula serosa, embriões de insetos tornam-se resistentes à dessecação..... 26
- Figura 8: Cinética de formação da cutícula serosa em ovos de *T. castaneum*. A formação da cutícula serosa ao longo do tempo foi avaliada a partir da porcentagem de ovos resistentes à digestão por cloro (Rezende *et al.* 2008). Depois da formação da cutícula serosa, que ocorre em torno de 15 horas depois da postura, os ovos ficam resistentes à ação do cloro. Retirado de Menezes (2014)..... 26

Figura 9: Esquema hipotético da composição da cutícula serosa dos insetos. A cutícula serosa seria dividida entre uma camada amarela composta por lipídios e proteínas e uma camada branca composta por quitina e proteínas. Adaptado de Rezende 2008. .... 27

Figura 10: Via de alongamento de ácidos graxos de cadeia muito longa. Ao final do processo, o estearil-CoA formado, possuindo 18 carbonos, pode passar por uma nova série de reações de alongamento, gerando um acil-CoA de 20 carbonos e assim sucessivamente. R: cadeia com 15 carbonos. Adaptado de Cook & McMaster (2002). .... 29

Figura 11: Estrutura genômica de *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03*, *Tc-elovl04*, *Tc-elovl07*, *Tc-Rps6*, *Tc-verm* e *Tc-zen1*. Exons estão representados como retângulos. As partes coloridas são ORF e as partes em branco são UTRs. Os primers estão representados pelas pequenas formas geométricas coloridas. A escala de 1000 pb está indicada abaixo de cada gene. .... 34

Figura 12: Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos de *Ag-elovl01* e dos 18 parálogos de *elovl* encontrados no genoma de *T. castaneum*. O domínio conservado empregado na identificação dos genes está grifado em amarelo. O trecho grifado em verde indica o domínio Pfam ELO GNS1/SUR4 de *An. gambiae*. A linha Consensus indica os aminoácidos idênticos (\*), altamente conservados (:) e conservados (.) entre as sequências avaliadas. Alinhamento realizado no programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). .... 38

Figura 13: *Tiling arrays* da expressão, com 14 horas de embriogênese, das regiões gênicas dos 18 parálogos de genes *elovl* de *T. castaneum*. Cada região gênica foi delimitada pelas suas extremidades 5' e 3' contendo a região codificadora da proteína. Quando presentes, traços e retângulos em verde representam exons e introns, respectivamente, obtidos de sequências de mRNA (algumas parciais ou incompletas) presentes no BeetleBase. Barras azuis representam níveis de expressão gênica. Cada barra azul é uma sonda de tiling array composta de 50 a 65 nucleotídeos. As barras entre diferentes genes possuem espessuras distintas devido às diferentes escalas horizontais. O gene *Tc-elovl18* é o único que não possui introns. .... 42

Figura 14: Expressão gênica na embriogênese de *T. castaneum*. Foi realizada PCR com DNA genômico (DNAg) e RT-PCR com cDNAs obtidos a partir de 2, 6, 10, 14, 28 e 48 horas após a postura (HAP) para os genes: A: *Tc-elovl01*, B: *Tc-elovl02*, C: *Tc-elovl03*, D: *Tc-elovl04*, E: *Tc-elovl07*, F: *Tc-Rps6*, G: *Tc-Zen1* e H: *Tc-verm*. Para cada gene, o tamanho de banda esperado para o DNA genômico está indicado ao lado ou acima da respectiva banda e para o cDNA está indicado à direita da banda de 48 HAP. M: marcador de peso molecular. .... 47

Figura 15: Alinhamento dos contigs dos genes sequenciados com as sequências disponíveis no GenBank do NCBI. Alinhamento realizado no programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A numeração acima do alinhamento refere-se às sequências do GenBank. A linha consensus indica os nucleotídeos idênticos (\*). .... 56

Figura 16: Hibridizações *in situ* para *Tc-zen1* e marcação com DAPI em ovos de *T. castaneum*. A e B: *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração avermelhada é background). A' e B': DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda). (A e A'): sonda antisense com expressão específica de *Tc-zen1* na serosa. (B e B'): sonda senso para *Tc-zen1* não apresenta marcação. .... 57

Figura 17: Hibridizações *in situ* para *Tc-elovl01* e marcação com DAPI em ovos de *T. castaneum*. A e B: *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração vermelha é background). A' e B': DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda). Em A e A' o embrião está em posição ventral. Em B e B' a região dorsal está para cima. (A e A'): sonda antisense com expressão

específica de *Tc-elov101* na serosa. (B e B'): sonda senso para *Tc-elov101* não apresenta marcação..... 58

Figura 18: Hibridizações *in situ* para *Tc-elov102* e marcação com DAPI em ovos de *T.castaneum*. **A, B, C, D:** *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração vermelha é *background*). **A', B', C', D':** DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A marcação com DAPI na imagem **A'** não ficou clara, porém o embrião encontra-se no estágio similar ao que é visto na figura 20A'. Na imagem **B'** a linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda). Em **C'** e **D'** a serosa envolve o embrião por completo (vide figura 5D da introdução).. Em **A'** e **B'** o polo anterior está para a esquerda e dorso para cima; em **C'** e **D'** a serosa circunda o embrião por completo. (**A e A'**): sonda antisenso de *Tc-elov102* com fraca marcação na serosa. (**B e B'**): sonda senso para *Tc-elov102* com fraca marcação roxa não específica. (**C e C'**): sonda antisenso de *Tc-elov102* com forte marcação específica na serosa. (**D e D'**): sonda senso para *Tc-elov102* com *background* apenas na região central..... 59

Figura 19: Hibridizações *in situ* para *Tc-elov103* e DAPI em ovos de *T.castaneum*. **A, B, C, D:** *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração avermelhada é *background*). **A', B', C', D':** DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda) Em todos os painéis o polo anterior está para a esquerda. **A', C', D'**: o dorso está para cima. **B'**: o embrião está em posição dorso-lateral. (**A e A'**): sonda antisenso de *Tc-elov103* com forte marcação na região dorsal da serosa. (**B e B'**): sonda senso para *Tc-elov103* sem marcação. (**C e C'**): sonda antisenso de *Tc-elov103* com marcação na serosa e primórdio embrionário. (**D e D'**): ovos marcado com sonda senso para *Tc-elov103* com tênue marcação inespecífica no primórdio embrionário..... 60

Figura 20: Hibridizações *in situ* para *Tc-elov104* e DAPI em ovos de *T. castaneum*. **A e B:** *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração avermelhada é *background*). **A' e B':** DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda) no painel **A'**. No painel **B'** a serosa envolve o embrião quase que por completo (vide figura 5D da introdução). Em **A** e **A'** a região dorsal está para cima. Em **B** e **B'** a vista frontal do embrião é a parte ventro-lateral (**A e A'**): sonda antisenso com expressão específica de *Tc-elov104* na serosa. (**B e B'**): sonda senso para *Tc-elov104* com fraca marcação roxa não específica. .... 61

Figura 21: Hibridizações *in situ* para *Tc-elov107* e DAPI em ovos de *T. castaneum*. **A e B:** *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração vermelha é *background*). **A' e B':** DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda) no painel. Em **B** e **B'** vista frontal do embrião é a parte ventro-lateral (**A e A'**): sonda antisenso sem expressão específica de *Tc-elov107* na serosa. (**B e B'**): sonda senso para *Tc-elov107* sem marcação específica. Como a fraca marcação roxa está presente tanto em **A** quanto em **B**, trata-se de *background*. .... 62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos primers para <i>Tc-elovl</i> , <i>Tc-Rps6</i> , <i>Tc-zen1</i> e <i>Tc-verm</i> .....	33
Tabela 2. Parâmetros das sequências <i>Tc-elovl</i> encontradas através do tBlastn (GenBank) realizado contra Ag ELOVL1 .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

*Ag-elo1* – Gene elongase 1 de *Anopheles gambiae*

cDNA – DNA complementar

Daa – dobra amniótica anterior

Dap – dobra amniótica posterior

*elo1* – Gene elongase

ELOVL – Enzima elongase

FA – Do inglês *fatty acid*, significa ácido graxo

HAP – Horas após a postura

PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

pRNAi – RNA de interferência parental

ROD – Resistência dos ovos à dessecação

RNAi – RNA de interferência

*Tc-elo1* – Gene *elongase 1* de *Tribolium castaneum*

VLCFA – Do inglês *very-long chain fatty acid*, significa ácido graxo de cadeia muito longa

## RESUMO

Insetos possuem diferentes formas para minimizar a perda de água em seus distintos estágios de vida. Recentemente no besouro *Tribolium castaneum* foi descrito que a formação da cutícula serosa é importante para garantir a resistência dos ovos à dessecação minimizando assim a perda de água. As células da serosa (uma membrana extraembrionária) secretam a cutícula serosa ainda no primeiro quarto da embriogênese. Pouco sabe-se ainda sobre a composição dessa cutícula. Evidências indiretas apontam para a presença de lipídios ou derivados na mesma. Por exemplo, já foi mostrado na serosa do mosquito *Anopheles gambiae* e também na serosa de *T. castaneum*, a expressão do gene *elongase01 (elovl01)*. Genes *elovl* codificam elongases, enzimas que atuam na síntese dos ácidos graxos de cadeia muito longa e que estão relacionados com a impermeabilização cuticular de mamíferos e plantas. Neste trabalho caracterizamos a expressão dos genes *elovl* na serosa do besouro *T. castaneum*. A partir do programa de alinhamento de sequências *tblastn* do *GenBank* e usando a sequência da proteína Ag-ELOVL01 como *query*, foram encontrados 18 parálogos *elovl* no genoma de *T. castaneum*. As avaliações de expressão do *tiling array* existente na plataforma *BeetleBase* mostraram que dos 18 parálogos apenas quatro (*Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04*), apresentam perfil de expressão elevada com 14 horas de embriogênese (momento em que a cutícula serosa está sendo formada). Os demais genes apresentaram expressão residual ou não eram expressos com 14 horas de embriogênese. As análises de RT-PCR confirmaram que os quatro genes *Tc-elovl01-04* são expressos durante a embriogênese enquanto o gene *Tc-elovl07* (empregado como controle negativo) está ausente durante esse estágio de vida. Os genes *Tc-elovl01-04* e *Tc-elovl07* foram clonados e sequenciados: os *contigs* gerados correspondem às sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank*, com exceção de alguns poucos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em todas as sequências e de um *splice* alternativo para *Tc-elovl04*. As hibridizações *in situ* confirmaram a expressão de *Tc-elovl01* a *04*, mas não de *Tc-elovl07*, na serosa. Os resultados encontrados neste trabalho indicam uma participação de ácidos graxos de cadeia muito longa na estruturação da cutícula serosa, através da atuação das ELOLV 01 a 04.

**Palavras-chave:** cutícula serosa, embriogênese, elongases, *elovl*, resistência dos ovos à dessecação, serosa.

## ABSTRACT

Insects possess different approaches to avoid dehydration during its distinct life stages. In the beetle *Tribolium castaneum* it was recently described that serosal cuticle formation is relevant to ensure egg resistance to desiccation, minimizing water loss. The serosa cells, an extraembryonic membrane, secrete the serosal cuticle during the first fourth of embryogenesis. Little is known regarding the composition of this cuticle. Indirect evidences point out to the presence of lipids or lipid derivatives in its structure. For instance, expression of the *elongase01* (*elovl01*) gene was detected in the serosa of both *Anopheles gambiae* mosquito and *T. castaneum*. *Elovl* genes encode elongases, enzymes involved in the synthesis of very long-chain fatty acids which are related with cuticle waterproofing of plants and mammals. In this work we characterized the expression of *elovl* genes in the serosa of the beetle *T. castaneum*. Employing the *tblastn* sequence alignment program from *GenBank* and using Ag-ELOVL01 protein sequence query, 18 *elovl* paralogues were found in the *T. castaneum* genome. Evaluation of the tilling array expression present in the BeettleBase indicated that only four out of the 18 paralogues (*Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* and *Tc-elovl04*) showed a high expression profile with 14 hours of embryogenesis (when serosal cuticle is being formed). The other genes show residual expression or were not expressed with 14 hours of embryogenesis. RT-PCR assays confirmed that the four genes *Tc-elovl01-04*, but not *Tc-elovl07* (employed as a negative control), are expressed during embryogenesis. These genes were cloned and sequenced: the obtained contigs match those available in the GenBank database, except for a few single nucleotide polymorphisms (SNPs) in all sequences and an alternative splice for *Tc-elovl04*. *In situ* hybridizations confirmed expression of *Tc-elovl01* through *04* in the serosa whilst *Tc-elovl07* is not expressed in this tissue. The results of this work suggest a role for very long-chain fatty acids in serosal cuticle structuring, through the action of ELOVL 01-04.

**Keywords:** egg resistance to desiccation, elongases, *elovl*, embryogenesis, serosa, serosal cuticle

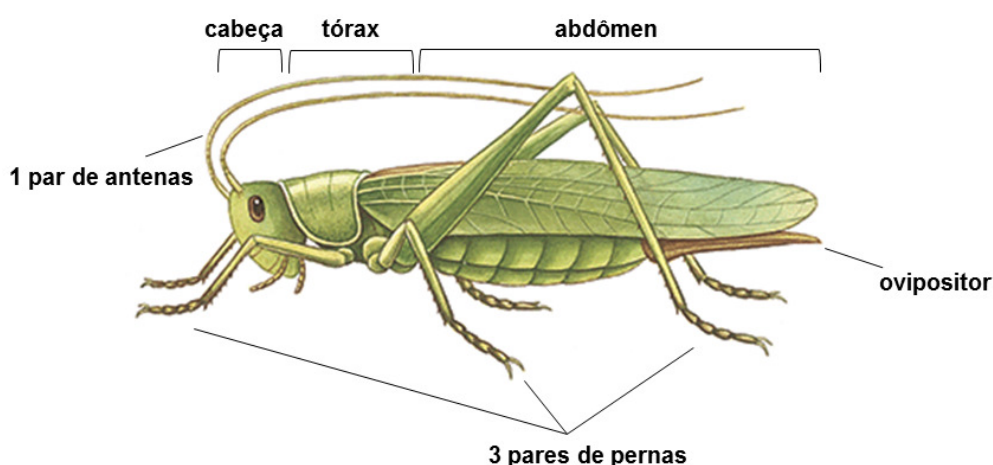


## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – A classe Insecta e sua relevância

A classe Insecta pertence ao filo Arthropoda e superclasse Hexapoda e constitui o grupo animal dominante do planeta Terra. As elevadas taxas de reprodução, o sistema nervoso complexo, a cutícula impermeável e a co-evolução com outros seres vivos são algumas das características que garantiram o êxito do grupo. Estão distribuídos por variados habitats e, mesmo a maioria de suas espécies sendo terrestre, o grupo apresenta um número significativo de espécies aquáticas (Grimaldi & Engel 2005, Brusca & Brusca 2007, Chapman 2013).

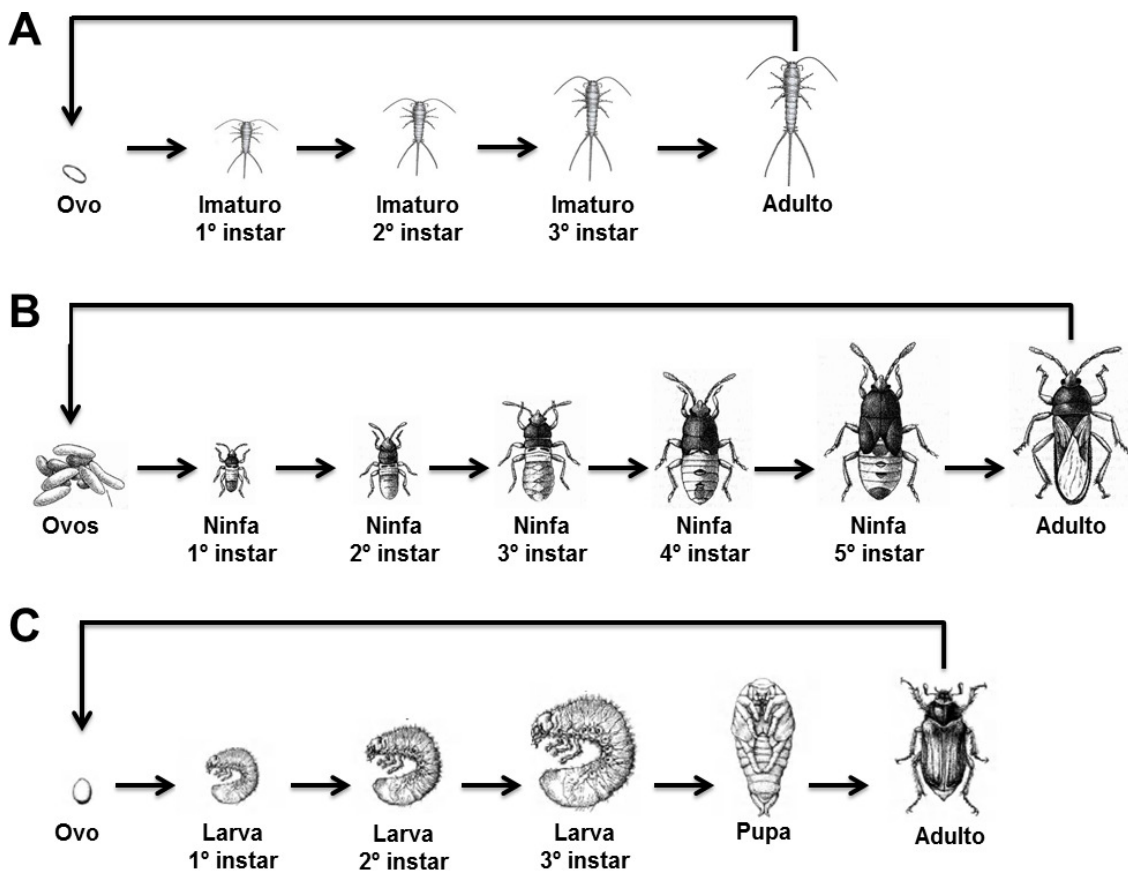
A estrutura corpórea dos insetos é dividida em três segmentos: cabeça e tórax, áreas ricas em apêndices especializados; além do abdômen. Na região cefálica encontram-se apêndices modificados com função sensorial e para alimentação. No tórax estão presentes os apêndices responsáveis pela locomoção (pernas e asas) enquanto a região abdominal é diferenciada devido à redução de apêndices, exceto pela presença da genitália (Figura 1) (Brusca & Brusca 2007, Chapman 2013).



**Figura 1: Esquema da estrutura corpórea de um inseto adulto.** Vista lateral do corpo de um gafanhoto (Orthoptera). Adaptado de [<http://www.fao.org/>].

O ciclo de vida dos insetos pode passar por diferentes tipos de desenvolvimento, mas em todos os casos consiste de fases imaturas e uma fase reprodutiva adulta. Há espécies de insetos, definidos como ametábolos,

que se desenvolvem sem passar por metamorfose, cujas formas imaturas são similares ao adulto, porém seus órgãos reprodutores são pouco desenvolvidos (Figura 2A). Os insetos hemimetábolos realizam metamorfose incompleta quando ocorrem pequenas alterações entre as ninfas (formas jovens) e o imago (forma adulta) sem que haja o estágio conhecido como pupa (Figura 2B). Nos insetos ditos holometábolos ocorrem variações bruscas entre a forma imatura e o imago, com a existência do estágio de pupa. As fases de vida desses insetos são baseadas em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2C). Dependendo da fase do desenvolvimento, o hábitat e os hábitos de nutrição são diferentes (Brusca & Brusca 2007).



**Figura 2: Esquema dos estágios de desenvolvimento de insetos ametábolos, hemimetábolos e holometábolos. A:** Desenvolvimento ametábolo de Apterygota. **B:** Desenvolvimento hemimetábolo de Hemiptera. **C:** Desenvolvimento holometábolo de Coleoptera. Adaptado de [<http://bjresumos.blogspot.com.br/>], Ruppert & Barnes 1996.

Os insetos têm grande importância ecológica; sem este grupo acredita-se que o ecossistema da Terra seria diferente e que boa parte das espécies de vertebrados, que dependem deles como fonte de alimento, já teriam

desaparecido. São ainda polinizadores de um grande número de espécies de angiospermas; e também importantes na reciclagem de nutrientes, uma vez que degradam carcaças e esterco. Porém, podem gerar incômodos e serem prejudiciais para outros seres vivos. Mais de 1/6 das culturas cultivadas são perdidas todos os anos devido à ação de insetos herbívoros. Muitas espécies ainda são vetores de inúmeras doenças como dengue, febre amarela, filariose e leishmaniose. Por conta desses contextos há grande investimento financeiro para o controle dessas pragas ou vetores (Rey 2001, Brusca & Brusca 2007, Chapman 2013).

Ainda por apresentarem tamanho reduzido, alta taxa de reprodução, ciclo de vida curto, dieta simples, possibilidade de sincronizar o desenvolvimento e também por serem de fácil manutenção e manipulação em laboratório, muitas espécies de insetos tornaram-se importantes ferramentas de estudo. *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *Anopheles gambiae* (Diptera: Anophelinae), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicinae), *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) e *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) são exemplos de espécies usadas em diferentes áreas de pesquisa. Grandes achados foram feitos nas áreas da genética, fisiologia, imunologia, comportamento e ecologia a partir do estudo destas espécies (Klowden 2007, Chapman 2013). Genes homeobox, por exemplo, foram identificados pela primeira vez a partir de mutações na mosca da fruta *D. melanogaster* (Scott & Weiner 1984).

## **1.2 – O besouro *Tribolium castaneum***

A espécie *T. castaneum*, popularmente conhecida como besouro-castanho, foi descrita pela primeira vez em 1797 por Herbst. É uma espécie cosmopolita, distribuída por regiões tropicais, entre a América do Sul e a Ásia, e de forte associação com humanos por ser uma das maiores pragas de alimentos estocados. O principal material infestado por essa espécie é a farinha, de trigo ou de milho; no entanto, *T. castaneum* apresenta-se também como praga secundária de grãos armazenados (Good 1936, van Emden 2013). Seu ciclo de vida é rápido, de ovo até adulto (Figura 3), dura 21 dias a 35 °C e

75% de umidade relativa, embora possa se desenvolver entre 22 e 40 °C (Lorini 2002).



**Figura 3: Estágios de vida do besouro *T. castaneum*. A: ovo; B: larva; C: pupa e D: adulto.** Os painéis não estão na mesma escala. Adaptado de: **A:** Rezende 2008, **B e C:** [<http://entomovores.ze-forum.com/>], **D:** [<http://agrolink.com/>].

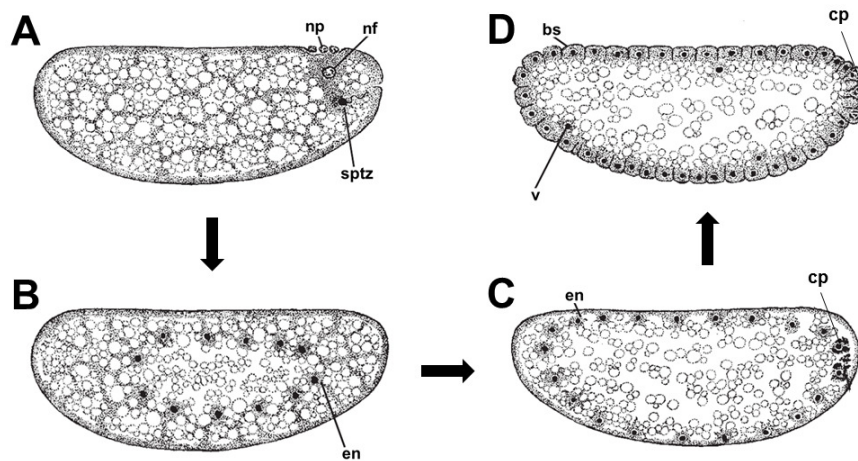
Pouco se conhece sobre o nicho ecológico e a procedência geográfica da espécie antes da sua adaptação aos hábitos humanos, mas acredita-se que tenha se originado no Velho Mundo, na região onde hoje é a Índia, vivendo em troncos apodrecidos e embaixo de cascas de árvores, habituada a alimentar-se de fungos (Good 1936, Dawson 1977, Hunt *et al.* 2007). Sabe-se hoje que a principal fonte de alimento desses besouros é o milho, porém são capazes de se alimentar de arroz, trigo e sorgo (Lorini 2002).

O besouro-castanho é um organismo modelo usado em diferentes áreas de pesquisa. Inicialmente *T. castaneum* foi objeto de estudos de genética de populações (Sokoloff 1964). Os trabalhos iniciais subsidiaram o desenvolvimento dos estudos de diferenciação de população (DeMuth & Wade 2007a, 2007b), genética reversa comparativa (Brown *et al.* 1994, Tomoyasu *et al.* 2005, Ober & Jockusch 2006, Savard *et al.* 2006) e produção de indivíduos transgênicos (Eckert *et al.* 2004, Lorenzen *et al.* 2007). Atualmente, a disponibilidade do genoma sequenciado e de ferramentas genéticas funcionais como o RNAi sistêmico (Bucher *et al.* 2002, Richards *et al.* 2008) tem feito da espécie um modelo versátil, empregado em áreas tão diversas quanto biologia evolutiva do desenvolvimento e sistema imune (Zou *et al.* 2007, Altincicek *et al.* 2008, Bérenos *et al.* 2009, Brown *et al.* 2009). Outro fator que corrobora o uso de *T. castaneum* como espécie modelo é a facilidade de manutenção de suas colônias (Watt 1974).

Mesmo possuindo características particulares, *T. castaneum* é um bom modelo para o estudo comparativo da evolução e do desenvolvimento de insetos e artrópodes quando confrontado ao modelo atual, o Diptera *D. melanogaster*. Embora ambas as espécies sejam holometábolos, as características de *T. castaneum* são mais ancestrais; *D. melanogaster* apresenta muitas peculiaridades e desenvolvimento mais derivado, frente aos demais insetos (Klingler 2004, Savard *et al.* 2006, Schroder *et al.* 2008, Brown *et al.* 2009). Nosso grupo tem empregado *T. castaneum* como inseto modelo para investigar o processo de definição das membranas extra-embrionárias e a resistência dos ovos à dessecação (Rezende 2008, Jacobs *et al.* 2013, Menezes 2014).

### **1.3 – Desenvolvimento embrionário inicial de *T. castaneum***

Depois de *D. melanogaster*, a embriogênese de *T. castaneum* é a melhor descrita dentre as espécies de insetos, além de se assemelhar à maioria das espécies de insetos conhecidas (Counce 1961, Klowden 2007, Schroder *et al.* 2008, Brown *et al.* 2009). O desenvolvimento embrionário inicia-se após a fertilização do ovócito (Figura 4A) e então o núcleo haplóide feminino funde-se ao espermatozóide formando o que chamamos de núcleo zigótico. Este sofre diversas clivagens mitóticas e dá origem aos energídeos (Figura 4B). Os energídeos são núcleos envolvidos por uma região de citoplasma enriquecida em microtúbulos que permanecem dispersos por todo o vitelo. Após inúmeras divisões os energídeos migram para as extremidades do ovo (Figura 4C) e formam o que conhecemos como blastoderma sincicial (Figura 4D) (Klowden 2007, Chapman 2013).

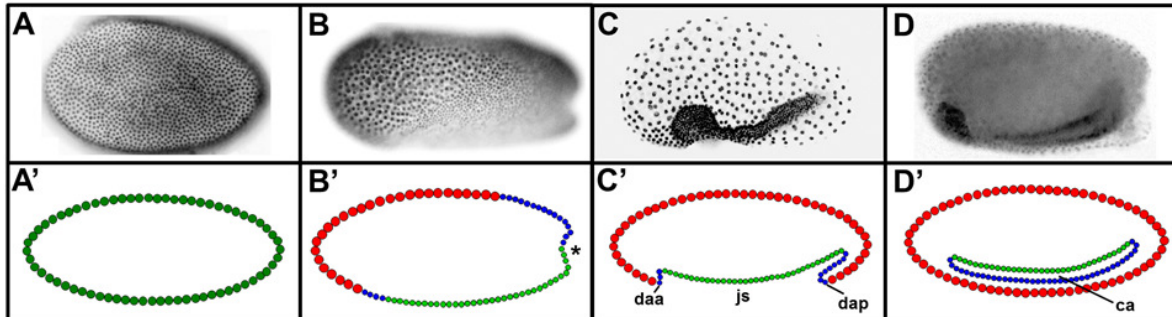


**Figura 4: Esquema do início do desenvolvimento embrionário de insetos.** **A:** ovócito fertilizado. **B:** Divisão mitótica dos energídeos. **C:** Migração dos energídeos para região periférica e início da formação das células polares. **D:** Formação do blastoderma sincicial e definição das células polares. **bs:** blastoderma sincicial, **cp:** células polares, **en:** energídeo, **nf:** núcleo feminino, **np:** núcleos polares, **sptz:** espermatozóide, **v:** vitelóforo. Adaptado de Klowden (2007) a partir de Johansen & Butt (1941).

Cerca de 20 energídeos permanecem na região central do ovo para formar os vitelóforos, células que em momento posterior da embriogênese auxiliarão na digestão do vitelo e na formação do epitélio do intestino médio. Outros dois ou três energídeos migram para o pólo posterior do ovo e formam as células polares, que darão origem às células germinativas do futuro adulto (Figura 4C, D). Depois que as células polares se diferenciam, os energídeos do blastoderma sincicial passam a ser circundados por membranas, formando uma monocamada de células, conhecida como blastoderma celular indiferenciado (Figura 5A, A') (Counce 1961, Klowden 2007, Chapman 2013). Em seguida, a exemplo do que ocorre na maioria dos insetos, a região ventro-posterior do blastoderma de *T. castaneum* diferencia-se em células que darão origem ao embrião (também chamadas coletivamente de banda germinal), enquanto o resto do blastoderma origina o tecido extra-embrionário, composto de duas membranas: o âmnio e a serosa (Figura 5B, B') (Handel *et al.* 2000). A relevância do epitélio extra-embrionário será melhor detalhada no item 1.4.

A região posterior começa a invaginar e forma o poço primitivo (Figura 5B, B') marcando o início da gastrulação, fase que consiste na definição dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma. A serosa se estende, a banda germinal adentra o vitelo e o âmnio forma as dobras amnióticas, anterior e posterior, originando assim a 'janela da serosa' (Figura

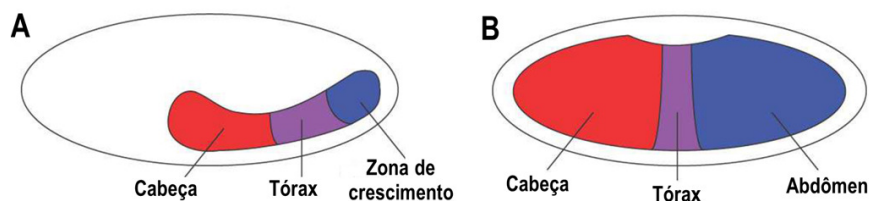
5C, C'). Por fim, a janela da serosa se fecha por completo e âmnio e serosa se separam. Em seguida a banda germinal inicia sua extensão, a serosa envolve completamente o embrião, âmnio e vitelo; o âmnio recobre ventralmente o embrião e forma a cavidade amniótica (Figura 5D, D') (Brown *et al.* 1994, Handel *et al.* 2000, 2005, Benton *et al.* 2013)



**Figura 5: Esquema da diferenciação do blastoderma celular, definição das membranas extraembrionárias e início da gastrulação em embrião de *T. castaneum* mantido a 30 °C.** **A-D:** Marcação nuclear com DAPI. **A'-D':** Esquema representativo dos diferentes tipos celulares presentes em A-D. Verde escuro: blastoderma celular indiferenciado, vermelho: serosa, azul: âmnio, verde claro: embrião. **A, A':** Blastoderma celular indiferenciado. **B, B':** Blastoderma celular diferenciado e início da gastrulação. **C, C':** Âmnio e banda germinal invaginam-se e a serosa começa a circundá-los. **D, D':** Serosa engloba âmnio e a banda germinal. A banda germinal inicia o processo de extensão. As células da serosa são polipóides e maiores que aquelas do âmnio e do embrião, estas diplóides. ca: cavidade amniótica, daa: dobra amniótica anterior, dap, dobra amniótica posterior, js: janela da serosa, o asterisco indica a região do poço primitivo. Região anterior está voltada para a esquerda e a região dorsal para cima. Embrião A com 8 horas de desenvolvimento embrionário. Embriões de B-D entre 10 e 14 horas de desenvolvimento embrionário. Esquemas A'-D' baseados em Rafiqi *et al.* (2008). Imagem A retirada de Menezes 2014; C: adaptada de Rezende 2008; B e D: Helena Vargas.

O embrião de *T. castaneum*, como de muitos insetos, é definido como de banda curta, uma vez que apenas uma pequena porção do blastoderma celular diferencia-se no embrião, ocupando um espaço limitado dentro do ovo no início da gastrulação. Assim seu padrão de segmentação é distinto do inseto mais conhecido: *D. melanogaster*. A região anterior do embrião de banda curta é determinada primeiro enquanto a região posterior é determinada mais tardiamente, progressivamente a partir de uma zona de crescimento (Figura 6A) (Davis & Patel 2002, Sarrazin *et al.* 2012). Esse padrão difere em Diptera superiores, Lepidoptera e Hymenoptera, cujos embriões são banda longa, ou seja, a maior parte do seu blastoderma formará o embrião propriamente dito e a definição das regiões anterior e posterior é simultânea (Figura 6B) (Davis & Patel 2002).





**Figura 6: Esquema de embrião de insetos ‘banda curta’ e ‘banda longa’.** **A:** Esquema de embrião banda curta, comum em grande parte dos insetos. Os embriões ocupam apenas uma pequena porção dentro do ovo no início da gastrulação. **B:** Esquema de embrião banda longa, comum para Diptera superiores, Lepidoptera e Hymenoptera. Neste caso os embriões ocupam maior espaço dentro do ovo no início da gastrulação. Adaptado de Kimelman & Martin 2012.

As etapas seguintes da embriogênese são o prosseguimento da gastrulação, extensão máxima e retração da banda germinal, definição das regiões cefálica, torácica e abdominal. A região dorsal se fecha por completo, o intestino é internalizado e ocorre a finalização da organogênese. A larva então formada passa a exibir movimentos musculares e está pronta para eclodir (Panfilio *et al.* 2013).

#### 1.4 – O papel das membranas extra-embrionárias durante a embriogênese de insetos

Como relatado anteriormente, durante a embriogênese parte do blastoderma celular diferencia-se em células embrionárias e parte dá origem ao epitélio extra-embrionário (âmnio e serosa). A presença de duas membranas que envolvem o embrião é uma característica sinapomórfica dentre os insetos. A ausência de uma das estruturas ou a redução do tecido extra-embrionário, como ocorre em dípteros superiores, é considerado então um fator derivado (Panfilio 2008).

As membranas extra-embrionárias desempenham diferentes papéis ao longo do desenvolvimento embrionário (Panfilio 2008). A serosa estaria relacionada com o catabolismo do vitelo durante grande parte da embriogênese e também atuaria no transporte ativo de metabólitos que seriam enviados para dentro da cavidade amniótica (Lamer & Dorn, 2001). Por estarem dispostas ao redor do embrião, serosa e âmnio teriam uma função protetora (Zeh *et al.* 1989). O âmnio ainda formaria uma cutícula que contribuiria para a cutícula embrionária (Dorn 1976). A serosa é importante para o sistema imune inato, protegendo o embrião contra infecções por patógenos e toxinas ambientais

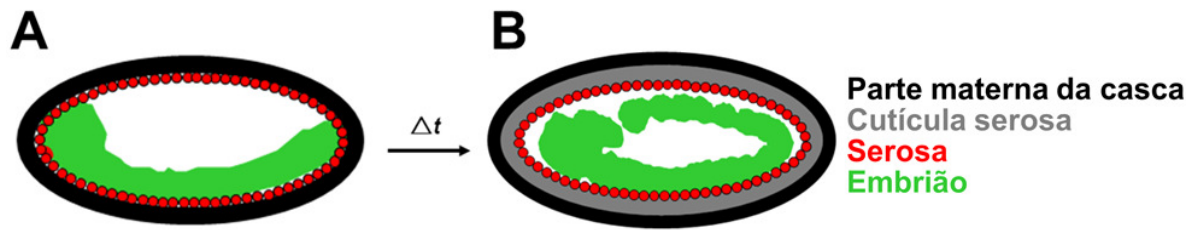


(Berger-Twelbeck *et al.* 2003, Gorman *et al.* 2004, Jacobs & van der Zee 2013), além de desempenhar outros papéis. Durante a embriogênese de *Carausius morosus* (Phasmatodea: Diapheromeridae), a serosa é essencial para o transporte de polipeptídeos vitelínicos para o fluido perivitelínico (Fausto *et al.* 2001). Nas espécies *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae) (Grimaldi *et al.* 2006) e *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) (Sabri *et al.* 2011), a serosa persiste mesmo após a formação e eclosão da larva e penetra no tecido do hospedeiro garantindo o transporte de nutrientes e também possibilitando a respiração. Sugere-se ainda que a serosa teria uma função excretora em *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae) (Dorn 1976, 1978).

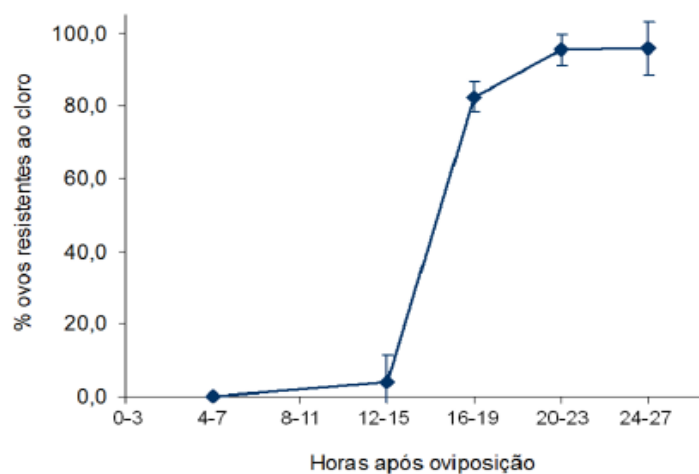
Além das funções descritas acima, a serosa tem papel na regulação da passagem de água (Slifer 1932, Cobben 1968, Mori 1972 *apud* Dorn 1976, Zeh *et al.* 1989) e é responsável por secretar a cutícula serosa (Beckel 1958, Furneaux & Mackay 1976, Woods *et al.* 2005), que é relevante para proteger os embriões em desenvolvimento contra a perda de água, conforme será explicitado abaixo.

### **1.5 – A cutícula serosa e a resistência dos ovos à dessecação**

A resistência dos ovos à dessecação (ROD) é a capacidade que os ovos de insetos têm de minimizar a perda de água durante o desenvolvimento embrionário. Este fenômeno ocorre tanto em espécies que depositam seus ovos em ambiente terrestre (como o besouro *Tribolium castaneum*) quanto na água (como é o caso de mosquitos). Como citado anteriormente, a cutícula serosa é importante para garantir a ROD. A cutícula serosa é uma matriz extraembrionária formada pela serosa (Figura 7) no primeiro quarto da embriogênese, estando presente em diferentes grupos de insetos (Slifer 1937, Lincoln 1961, Hartley 1962, Handel *et al.* 2000, Lamer & Dorn 2001, Machida 2006, Rezende *et al.* 2008, Goltsev *et al.* 2009, Chapman 2013, Vargas *et al.* 2014). Em *T. castaneum*, a cutícula serosa é formada aproximadamente entre 13 e 18 horas de desenvolvimento (Figura 8) quando os ovos são mantidos a 30 °C (Menezes 2014).

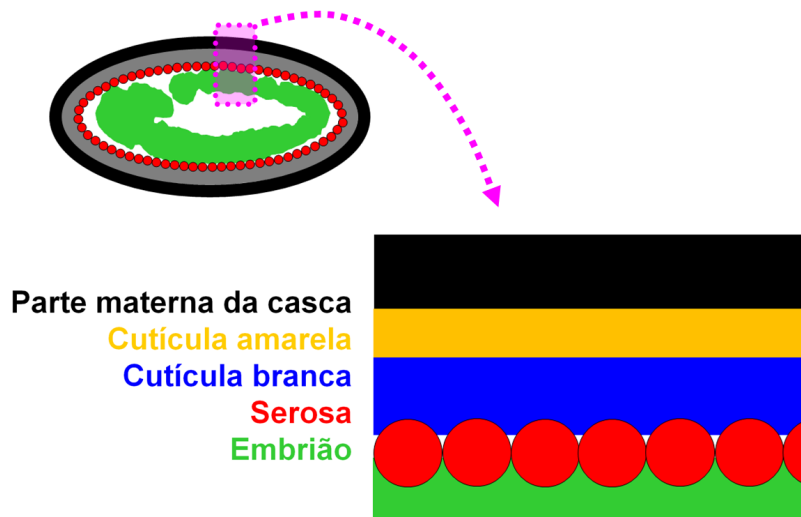


**Figura 7: Esquema do processo de formação da cutícula serosa em embrião de *Aedes aegypti*.** A cutícula serosa (em cinza) é sintetizada pelas células da serosa (em vermelho). Adaptado de Rezende *et al.* (2008). Após a formação da cutícula serosa, embriões de insetos tornam-se resistentes à dessecação.



**Figura 8: Cinética de formação da cutícula serosa em ovos de *T. castaneum*.** A formação da cutícula serosa ao longo do tempo foi avaliada a partir da porcentagem de ovos resistentes à digestão por cloro (Rezende *et al.* 2008). Depois da formação da cutícula serosa, que ocorre em torno de 15 horas depois da postura, os ovos ficam resistentes à ação do cloro. Retirado de Menezes (2014).

Embora importante para o desenvolvimento do embrião, pouco se sabe sobre a composição da CS. Alguns autores descrevem que a cutícula serosa seria dividida em duas sub-camadas: uma cutícula amarela, mais externa, composta por proteínas e lipídios; e uma cutícula branca composta por proteínas e quitina, um polissacarídeo estrutural (Figura 9) (Slifer 1937, Beckel 1958, Hartley 1962, Rezende 2008).



**Figura 9: Esquema hipotético da composição da cutícula serosa dos insetos.** A cutícula serosa seria dividida entre uma camada amarela composta por lipídios e proteínas e uma camada branca composta por quitina e proteínas. Adaptado de Rezende 2008.

A existência de quitina na composição da CS foi confirmada em ovos de Diptera e Coleoptera (Beckel 1958, Rezende *et al.* 2008, Goltsev *et al.* 2009, Jacobs *et al.* 2013). A presença de lipídios ou seus derivados na cutícula serosa ainda não foi confirmada, porém evidências indiretas apontam para presença de tais biomoléculas na cutícula serosa de gafanhotos, mosquitos e besouros (Slifer 1937, Rezende 2008, Goltsev *et al.* 2009). Rezende (2008) apresenta indicativos moleculares da presença de lipídios ou seus derivados na cutícula serosa de mosquitos e besouros: identificou, por meio de transcriptoma, que o gene *Ag-elongase01(elovl01)* é um dos mais expressos na serosa do mosquito *An. gambiae*, precisamente no momento em que essas células se preparam para produzir a cutícula serosa. O autor também identificou a expressão do gene *Tc-elovl01* nas células da serosa de *T. castaneum*.

## 1.6 – A família dos genes *elongase (elovl)* e seu papel na impermeabilização

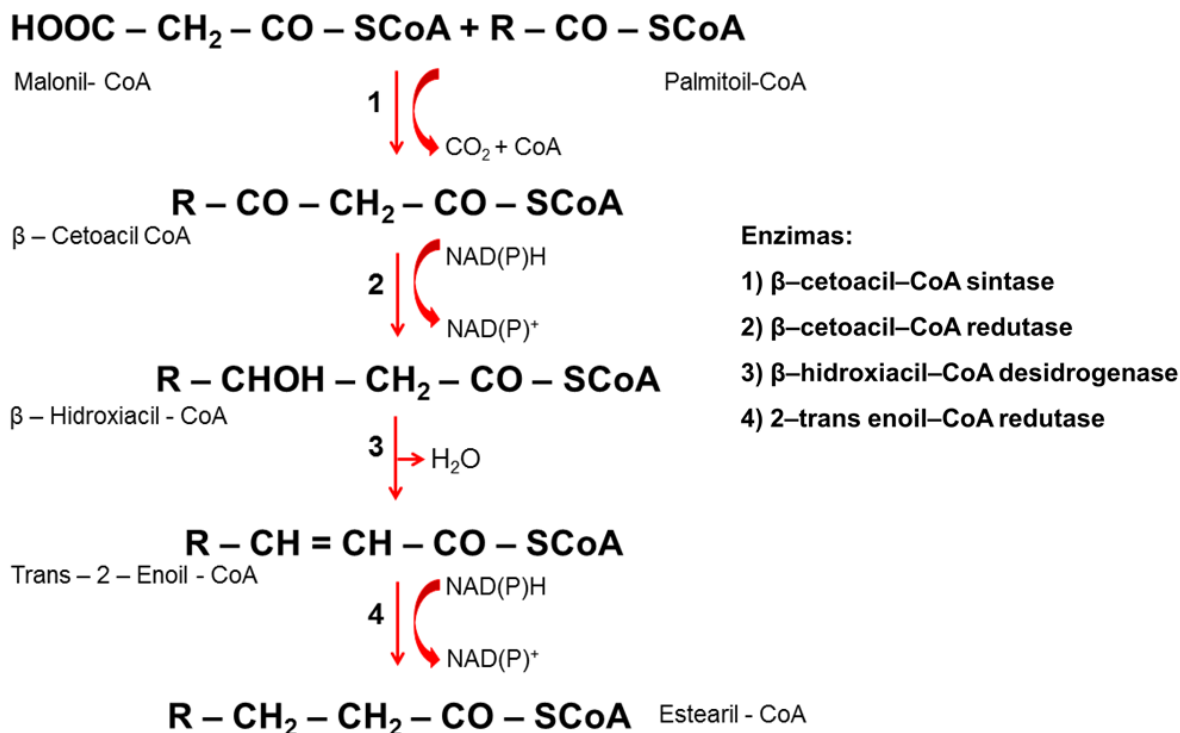
Genes *elovl* estão presentes em diversos organismos eucarióticos, incluindo leveduras, nematoides, insetos, camundongos e humanos; e codificam enzimas elongases (E.C. 2.3.1.199). As sequências das elongases apresentam características bem conservadas: cinco regiões

transmembranares, um *motif* enriquecido de histidina (HxxHH) além de outros *motifs* bem conservados: KxxExxDT, HxxMYxYY, TxxQxxQ. (Leonard *et al.* 2004, Jakobsson *et al.* 2006). As elongases atuam como etapa limitante da via de biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA, do inglês *very long-chain fatty acid*) que ocorre no retículo endoplasmático. Os VLCFAs são ácidos graxos com 18 ou mais carbonos em sua cadeia; são precursores de fosfolipídios de cadeia muito longa, de hidrocarbonos de cadeia muito longa e de ésteres de cera (Cook & McMaster 2002, Leonard *et al.* 2004).

O alongamento da cadeia de ácido graxo, para gerar os VLCFA é feito a partir da adição de 2 carbonos na molécula de palmitato (ácido graxo que possui 16 carbonos). O processo de alongamento da cadeia emprega malonil-CoA como doador dos carbonos, NADPH como doador de elétrons e hidrogênio e utiliza quatro enzimas diferentes (Figura 10):

- 1)  **$\beta$ -cetoacil-CoA sintase** (também chamada de elongase, ELO ou ELOVL), que condensa palmitato e malonil-CoA, liberando CO<sub>2</sub> e formando assim um  $\beta$ -cetoacil-CoA;
- 2)  **$\beta$ -cetoacil CoA redutase**, que reduz o  $\beta$ -cetoacil-CoA gerando  $\beta$ -hidroxilacil-CoA;
- 3)  **$\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase** que desidrata  $\beta$ -hidroxilacil-CoA formando trans enoil-CoA;
- 4) **2-trans enoil-CoA redutase** que reduz o trans enoil-CoA gerando estearil-CoA (que possui 18 carbonos).

Ao final da via ocorre então, a adição de 2 carbonos à molécula de acil-CoA (Nelson & Cox 2000, Cook & McMaster 2002, Leonard *et al.* 2004, Jakobsson *et al.* 2006).



**Figura 10: Via de alongamento de ácidos graxos de cadeia muito longa.** Ao final do processo, o estearil-CoA formado, possuindo 18 carbonos, pode passar por uma nova série de reações de alongamento, gerando um acil-CoA de 20 carbonos e assim sucessivamente. R: cadeia com 15 carbonos. Adaptado de Cook & McMaster (2002).

Já foi descrito o papel específico dos genes *elov1* na impermeabilização cuticular em plantas e mamíferos. Trabalho realizado com tomate - *Lycopersicon esculentum* (Solanales: Solanaceae) - mostrou que plantas mutantes, com perda de função para um gene *elov1*, têm redução na formação de alcanos e aldeídos de cadeia longa (maiores que 30 carbonos), quando comparadas com o tipo selvagem, e têm a permeabilidade cuticular de seus frutos afetada (Vogg *et al.* 2004). Em camundongos - *Mus musculus* (Rodentia: Muridae) - a deleção do gene *elov14* afeta a permeabilidade cuticular de neonatos, levando-os a óbito, por desidratação. Além de alterar a permeabilidade da epiderme, a deleção de *elov14* altera a composição de lipídios na pele: mutantes apresentaram redução no número de VLCFA (>28 carbonos) e aumento de ácidos graxos de cadeia longa (16 e 18 carbonos) evidenciando a importância dos VLCFA para a impermeabilização cuticular (Cameron *et al.* 2007, Vasireddy *et al.* 2007).

## **2. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho se propôs a analisar a presença de transcritos de genes *elovl* na serosa dos ovos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae).

### **2.1 Objetivos específicos**

- a) Estimar quantos genes *elovl* são encontrados no genoma de *T. castaneum*
- b) Definir se, e quais, genes *elovl* são expressos na serosa de *T. castaneum* e que possivelmente estejam envolvidos com a síntese da cutícula serosa.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Manutenção da colônia de *Tribolium castaneum***

A colônia de *T. castaneum* (cepa Geórgia GA-1) é mantida em estufa seca a 30 °C e 70-80% de umidade relativa. Larvas e adultos permanecem em potes plásticos de 15x10x9 cm com farinha de trigo (marca Útil, Moinhos Vera Cruz AS, Juiz de Fora, MG, Brasil) obtida em mercados locais, que serve como fonte de alimento. Antes de ser utilizada a farinha é esterilizada, permanecendo por período de 24 horas a -70 °C seguido de 24 horas em estufa a 60 °C. Após esse período, a farinha é 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 (Betel ISSO 3310/1).

### **3.2 Obtenção de ovos**

Ovos com idade definida foram obtidos a partir de grupos de fêmeas adultas, com idade entre um e cinco meses. Os animais foram transferidos

para um pote plástico de 15x10x9 cm com farinha de trigo esterilizada (item 3.1) e mantidos por cerca de três a quatro horas em estufa seca a 30 °C e 70-80% de umidade relativa, realizando oviposição de forma contínua (Menezes 2014). Após este período, os adultos foram peneirados e recolocados na colônia e os ovos foram mantidos em farinha na estufa a 30 °C até a realização dos experimentos. Adultos foram separados dos ovos e os ovos foram separados da farinha com peneira de solo de, respectivamente, 700 e 300 µm de malha (Betel ISSO 3310/1).

### 3.3 Análises de bioinformática

Os bancos de dados do *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), *Ensembl Metazoa* (<http://metazoa.ensembl.org/index.html>) e *BeetleBase* (<http://beetlebase.org>), foram usados para determinar as sequências da família de genes *elovl* no genoma de *T. castaneum* (versão 3.0). Foi utilizada como sequência de entrada (*query*) a proteína ELOVL predita a partir do gene *Ag-elovl1*, sabidamente um dos genes mais expressos na serosa do mosquito *An. gambiae* (Rezende 2008, Goltsev *et al.* 2009). Foi realizado um *tblastn* (que compara a sequência de resíduos de aminoácidos do *query* contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos traduzidas para as seis sequências de leitura possíveis) com Ag-ELOVL01 contra o genoma de *T. castaneum*. As sequências encontradas foram definidas como ELOVL preditas a partir do *motif* HxxMYxYY, conservado nesta família (Jakobsson *et al.* 2006).

O perfil de expressão de cada gene *elovl* encontrado durante o desenvolvimento embrionário foi avaliado através dos dados de *tilling array* presentes no *BeetleBase*. Um *tilling array* consiste de um experimento de microarranjo em que as sondas são desenhadas de forma a cobrir todo o genoma de um organismo, o que possibilita a detecção da expressão de transcritos de qualquer região do DNA, mesmo transcritos desconhecidos. O programa *GenePalette* foi utilizado para observar a estrutura genômica de cada gene encontrado. Todos os alinhamentos foram realizados no programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

### 3.4 Avaliação da expressão gênica através de RT-PCR

A fim de confirmar que os genes *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04* são realmente expressos durante a embriogênese, conforme sugerido pelos dados obtidos do *tiling array*, foram realizadas RT-PCRs com ovos de *T. castaneum* em diferentes momentos do desenvolvimento embrionário: 2, 6, 10, 14, 28 e 48 horas após a postura (HAP). As seguintes características definem cada um desses momentos: 2 HAP, ocorre apenas a presença de mRNAs maternos; 6 HAP, quando já ocorreu a transição materno-zigótica de transcritos (Ribeiro, comunicação pessoal); 10 HAP, no estágio de blastoderma diferenciado; 14 HAP, quando a serosa está prestes a secretar a cutícula serosa; 28 HAP, no início da retração da banda germinal e 48 HAP, no início do fechamento dorsal.

Também foram realizados RT-PCRs para os genes *Rps6*, *zen1* e *vermillion* de *T. castaneum*. O gene constitutivo *Tc-Rps6* foi usado como controle positivo (Toutges *et al.* 2010) e o gene *Tc-elovl07*, supostamente sem expressão com 14 horas (vide itens 4.2 e 4.3), como controle negativo. O gene *Tc-zen1* é sabidamente expresso apenas na serosa (Falciani *et al.* 1996, van der Zee *et al.* 2005) enquanto *Tc-verm* só afeta a pigmentação dos olhos, sem afetar a formação da cutícula serosa (Chaudhari *et al.* 2015).

O gene *Rps6* é um gene constitutivo que codifica uma proteína ribossomal e foi utilizado como controle positivo. O gene *zen1* codifica um fator de transcrição que define a serosa, sendo expresso apenas neste tecido; serviu de controle para os ensaios de hibridização *in situ*. Os genes *zen1* e *vermillion* (este último responsável por definir a cor dos olhos nas larvas) servirão futuramente como controles para avaliação do papel dos gene *elovl* na formação da cutícula serosa através de RNAi

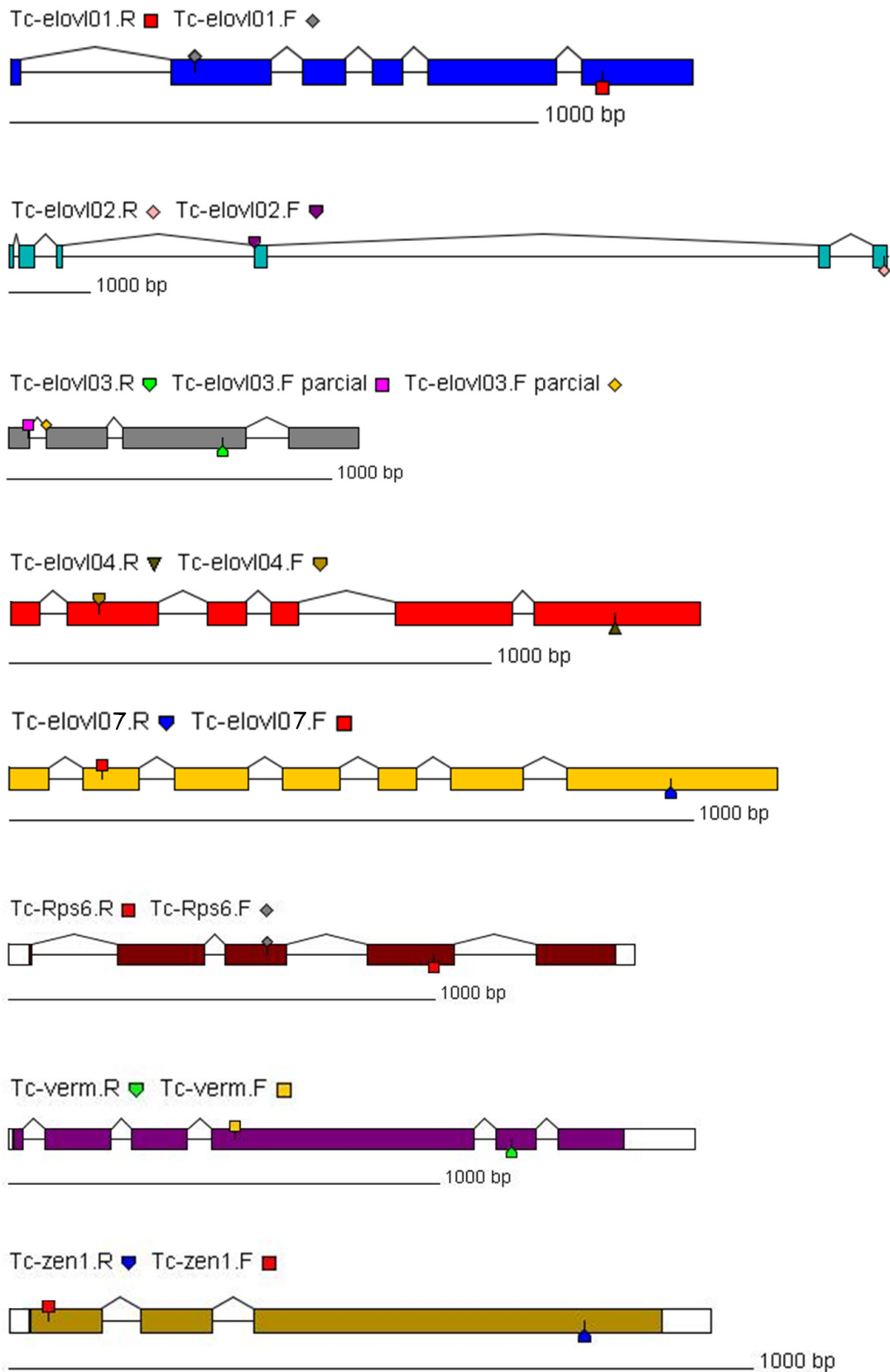
Os *primers* (iniciadores) para a realização de RT-PCR com os genes de interesse foram desenhados com o auxílio do programa Primer3web (v 4.0.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) (Tabela 1). Todos os *primers* foram desenhados em diferentes exons, flanqueados por pelo menos um intron. A estrutura genômica de cada gene foi visualizada no programa GenePalette (Figura 11).



**Tabela 1. Lista dos primers para *Tc-elov1*, *Tc-Rps6*, *Tc-zen1* e *Tc-verm***

<b>Gene</b>	<b>Primer Forward*</b>	<b>Primer Reverse*</b>
<b><i>Tc-elov101</i></b>	CCTCACCATAATTGCGACCT	TAATCACACTGCCGGAACAA
<b><i>Tc-elov102</i></b>	GGCAAACCTTATGCTGGTGGT	TTTGACCGACTTTTGCTTCC
<b><i>Tc-elov103</i></b>	TTGGAGATCCTCGGACAAAC	CCATTGCAGCAAGCAAGTAA
<b><i>Tc-elov104</i></b>	ATGAGAATGGCCAGAGGATG	CACTTCTTCGTCCTGGTGGT
<b><i>Tc-elov107</i></b>	GTCAAGTCCAGGCCCTACTG	GCAAGGCGTGGAACATTATT
<b><i>Tc-Rps6</i></b>	CAACTTGAGTGTGCTTGCCC	GCTGGATTTTGGGTGCCTTG
<b><i>Tc-zen1</i></b>	AAGCCGTTCTGCAGTCGTAT	CAAAGCCCAGTCAATCGTGC
<b><i>Tc-verm</i></b>	ACTTCCGGTGTTATCTGCGG	CCCCTGTTCCCTAACTGCGAA

\* Todos os primers estão escritos no sentido 5' -> 3'.



**Figura 11: Estrutura genômica de *Tc-elovI01*, *Tc-elovI02*, *Tc-elovI03*, *Tc-elovI04*, *Tc-elovI07*, *Tc-Rps6*, *Tc-verm* e *Tc-zen1*.** Exons estão representados como retângulos. As partes coloridas são ORF e as partes em branco são UTRs. Os primers estão representados pelas pequenas formas geométricas coloridas. A escala de 1000 pb está indicada abaixo de cada gene.

As extrações de RNA total foram realizadas com TRIzol® (Invitrogen, 15596-026) seguindo as informações do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado no Nanodrop. O cDNA das amostras foi sintetizado com o kit Superscript III (Invitrogen, 18080-400) seguindo as especificações do fabricante e utilizando 0,6 µl de oligo(dT) e 0,4 µl de *random hexamer primer*. As PCRs foram realizadas utilizando o kit PCR Master Mix (Fermentas, K0171) ou GoTaq® Green Master Mix (Promega, M7122), os fragmentos gênicos amplificados (amplicons) foram visualizados em gel de agarose 1,5%, marcados com o corante Safer (KASVI, K9-16C) ou GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, 41003) e registrados em sistema digital de fotodocumentação após exposição à luz UV.

### **3.5 Clonagem e sequenciamento dos amplicons**

Amplicons de interesse obtidos por RT-PCR foram purificados com o kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, 740609-10), quantificados no Picodrop ou Nanodrop e clonados no plasmídeo pGEM-T Easy Vector (Promega, A1360), de acordo com as especificações dos fabricantes. Plasmídeos contendo o inserto foram introduzidos em bactérias *Escherichia coli* DH5α competentes (cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro) por meio de transformação por choque térmico. Colônias positivas, detectadas por *colony PCR*, cresceram por 16 horas em meio seletivo LB (*Lysogeny Broth*) contendo ampicilina. Em seguida, seus plasmídeos foram isolados através de mini-prep utilizando o kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas, K0503), quantificados e sequenciados na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PDTIS, RPT01A), IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, de acordo com procedimentos padrão da Plataforma.

### **3.6 Fixação dos ovos**

Esses procedimentos foram realizados de acordo com van der Zee *et al.* (2005). Após lavagens em hipoclorito de sódio, ovos com idade entre 10 e 14 horas foram fixados em recipiente (*vial*) de vidro contendo mistura de PBS

(solução salina tamponada com fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*: 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 8% e heptano por 60 minutos, com a subsequente substituição da fase aquosa (PBS e formaldeído) por metanol gelado a -20 ou -70 °C, seguida de agitação vigorosa do recipiente. Os ovos foram lavados 4 vezes em metanol, transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e estocados a -20 °C até a utilização.

### **3.7 Preparo de sondas de RNA marcadas com DIG**

Foi adotado procedimento adaptado do protocolo de Kosman *et al.* (2004). O material clonado (item 3.5) foi usado na RT-PCR usando *primers* M13 *forward* e *reverse*. Os produtos de RT-PCR foram purificados e quantificados como descrito no item 3.6 e então submetidos às reações de transcrição *in vitro* em solução contendo: *transcription buffer*, DIG RNA labeling mix (Roche, 11277073910), ditioneitol (DTT) 5 mM, inibidor de RNase 1 U/μL, DNA molde (12,5-25 ng/μL), RNA polimerase (T7 ou SP6) 1,5 U/μL (Roche, 11175025910) em volume final de 20 μL. A reação foi incubada a 37 °C por 3,5 horas. Alíquotas de 1,5 μL da reação foram submetidas a eletroforese em géis de agarose 1% a fim de confirmar a síntese dos RNAs. Ao restante da reação foram adicionados 30 μL de H<sub>2</sub>O livre de RNase e então o RNA foi purificado com cloreto de lítio (LiCl) 0,56 M e 600 μL de etanol 100% livre de RNase. O material foi resuspenso em 200 ou 500 μL de solução de hibridização (DNA de esperma de peixe 0,1 mg/ml, heparina 0,05 mg/ml, SSC 5x - citrato de sódio salino, do inglês *saline-sodium citrate* - formamida 50%, Tween-20 0,01% e H<sub>2</sub>O livre de nucleases) e armazenado a -20 °C.

### **3.8 Hibridização *in situ* dos ovos**

Também para esta etapa foi utilizada adaptação do protocolo original de Kosman *et al.* (2004). Ovos pré-fixados (vide item 3.6) foram lavados com PBS por 3 minutos, 4 vezes, para retirada do metanol. Após incubação em etanol e xileno (1:9) por 1 hora, ovos foram lavados 2 vezes com etanol e incubados com etanol por 5 minutos. Seguimos com 2 lavagens em metanol, incubação

por 5 minutos em metanol e incubação por 5 minutos em uma mistura 1:1 de metanol e PBTF (Tween-20 a 0,1% e formaldeído 5% em PBS). Os embriões foram então lavados em PBTF e incubados por 25 minutos na mesma solução. Depois de 4 incubações de 5 minutos em PBT (PBS com Tween-20 a 0,1%), seguidas de imersão em 1:1 de solução de hibridização (DNA de esperma de peixe 0,1 mg/ml, heparina 0,05 mg/ml, SSC 5x, formamida 50%, Tween-20 a 0,01% e H<sub>2</sub>O livre de nucleases) e PBT por 10 minutos, os ovos foram incubados na solução de hibridização a 55 °C por 1 hora, com duas trocas neste intervalo. Ao final deste período, a mistura foi substituída por 100 µL da mesma solução, acrescida de 0,5 a 1 µL da sonda de RNA (item 3.7), previamente aquecida a 85 °C por 3 minutos e resfriada no gelo. O material permaneceu com a sonda de RNA por 16 horas. Após este período seguiram-se 4 lavagens de 15 minutos com PBT. Em seguida, a amostra foi tratada com *staining buffer* (H<sub>2</sub>O destilada, MgCl<sub>2</sub> 0,05 M, NaCl 0,1 M, TRIS-HCl 0,1 M e Tween-20 a 0,1%) durante 4 minutos, por 3 vezes. Seguimos com a incubação com o substrato NBT/BCIP, por período de 20 a 90 minutos, em média. O processo de coloração foi interrompido com lavagens de PBT, seguidas de oito lavagens com etanol 100% por 7 minutos. O material foi mantido a 4 °C até a visualização em microscópio óptico.

### **3.9 Marcação nuclear com DAPI e visualização no microscópio**

Com o propósito de avaliar a marcação dos embriões com as sondas de RNA, os embriões foram também marcados com DAPI, um fluoróforo que permite localizar os núcleos. Para isso, as amostras foram retiradas da temperatura de 4 °C (item 3.8) e o etanol foi substituído gradativamente por PBT. Foram então realizadas quatro lavagens com 1 mL de PBT e, ao final, 500 µL de PBT foram retirados e adicionou-se DAPI 5 µg/ml. O material permaneceu nesta mistura por 10 minutos e em seguida foi lavado em PBT por 4 vezes. As amostras foram observadas em microscopia de campo claro, DIC e fluorescência.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 O genoma de *T. castaneum* possui 18 parálogos de genes *elovl*

Ao todo, 18 parálogos de *elovl* foram encontrados no genoma de *T. castaneum* e nomeados de *Tc-elovl01* até *Tc-elovl18* de acordo com o valor decrescente da nota (*score*) do alinhamento com a sequência Ag-ELOVL01 (Tabela 2). As sequências de aminoácidos preditas a partir de *Tc-elovl01* a *04* apresentaram alta similaridade com o sequência de Ag-ELOVL01. A Figura 11 mostra o alinhamento das proteínas preditas incluindo a sequência da proteína de *An. gambiae*. O domínio *ELO GNS1/SUR4* do Pfam, que define as elongases, está destacado para a Ag-ELOVL01.

**Tabela 2. Parâmetros das sequências *Tc-elovl* encontradas através do tBlastn (GenBank) realizado contra Ag ELOVL1**

Nome da sequência	Número de acesso no GenBank	Max score*	Total score*	Query cover*	E-value*	Identidade*	Similaridade*
<i>Tc-elovl01</i>	XM_008201457.1	328	328	85%	4e-110	59%	76%
<i>Tc-elovl02</i>	XM_963543.3	281	281	81%	1e-90	54%	69%
<i>Tc-elovl03</i>	XM_963470.3	252	252	86%	4e-80	47%	65%
<i>Tc-elovl04</i>	XM_008199785.1	249	249	77%	6e-78	46%	62%
<i>Tc-elovl05</i>	XM_966451.2	247	247	82%	5e-76	46%	62%
<i>Tc-elovl06</i>	XM_963691.3	234	234	79%	1e-71	46%	64%
<i>Tc-elovl07</i>	XM_008201430.1	234	234	79%	3e-75	44%	63%
<i>Tc-elovl08</i>	XM_008201455.1	199	199	80%	8e-61	42%	61%
<i>Tc-elovl09</i>	XM_008201454.1	199	199	81%	2e-59	42%	59%
<i>Tc-elovl10</i>	XM_961434.2	191	191	89%	4e-56	38%	55%
<i>Tc-elovl11</i>	XM_008197754.1	185	185	79%	2e-55	42%	56%
<i>Tc-elovl12</i>	XM_008192621.1	177	177	80%	7e-53	38%	57%
<i>Tc-elovl13</i>	XM_968954.3	173	173	80%	3e-50	39%	56%
<i>Tc-elovl14</i>	XM_008192801.1	160	160	81%	4e-46	36%	53%
<i>Tc-elovl15</i>	XM_008196621.1	158	158	79%	2e-45	38%	54%
<i>Tc-elovl16</i>	XM_008202900.1	151	151	81%	2e-42	34%	54%
<i>Tc-elovl17</i>	XM_008202791.1	94,4	94,4	37%	8e-23	44%	61%
<i>Tc-elovl18</i>	XM_965421.3	62,8	62,8	73%	8e-11	27%	45%

- \* Max score: Maior pontuação do alinhamento entre a sequência de entrada (*query*) e a sequência específica obtida do banco de dados  
 Total score: Soma de todos os valores do alinhamento (*score*) de todos os segmentos da sequência de banco de dados que fazem referência à sequência de entrada.  
*Query cover*: Valor percentual de cobertura do alinhamento da sequência obtida em relação à sequência *query*.  
 E-value: Probabilidade do alinhamento ser um falso positivo. Quanto menor o E-value mais confiável é o alinhamento.  
 Identidade: Percentual de resíduos de aminoácidos idênticos encontrados no alinhamento em relação ao seu tamanho total.  
 Similaridade: Grau de similaridade entre as sequências. Está relacionado com sua conservação.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

Ag-elov101 -----VVVLCRFYTNLYPLYFR-PPHFVDERTKEWFLSGSITPLIMLIVTYLYFCIYAGPRYMAKRRPFKLEGVLIAYNAVQVLLSIVLVYEGIEGGWR--K--HYNYS

Tc-elov101 MGL--ANLMKVPINISLDYMDYINYYTYFL---ETKSDPRTSKWFLIGSPGPVLTIIATYLYFCIYAGPRYMKDRKPFDLKNAIIVYNFLQVIFSIPLVYEGLMGGWA---T--GYSKLC

Tc-elov102 MNN--TE-----MVGLVRMAFDRYHTIL---DRISDPRTSDWPLMQSPVPTIMMVVYLYVILILGPRFMANRKPFFKLREVLIAYNQAQVLYSLFMLEYEHLMGSGWF---W--DYSFKC

Tc-elov103 MA-----NGTVDKTFKGVYHFLF---TELGDPRNTDWFVLTHPVI--FPIVGFYLYFVTKLGPRLMKDRPFFDFKLILILYNAFQVVLISWLFWEALEGAYW---D--KYSWKC

Tc-elov104 -----MTQLIRNVIDGYHDLN---DNKSDPRVNDWFLMSSPFPTLLICLSYAYGVKVVGPKLMENRKPFFNLKYTLIFYNLFQVIFSTYLFYESAVAGWM---N--HYSFKC

Tc-elov105 -----MAHLVTSVIDKYEDIL---ENKSDPRVKGWAMMSSPMTLCLCFYAYFSTVLGPRIMENRKPFFNLKTLIFYNLFQVIFSAWIFYEYLMGSGWF---G--SYSFRC

Tc-elov106 -----MAFLLDLMRNVNSYL---NKYQDPRTADWPLMSSPFYTLGICLSYVVVVKVLPKLMENRKPFFQFKLLVFNFLQVVFSLWLFYEIGMGGW---TG--EYSIRC

Tc-elov107 -----MSSPGPTVAVCLSYVFLVKFVGPVKMEKKNPFFSLRKLIMAYNFFQVIFSAWLFYEFCASGWL---TG--EYSFRC

Tc-elov108 -----MALLLKKMFQGYFWLF---TEKDPDRSDGFFLMSSPLQPVLIQVAYLYLIYKILPKLMEKREPPFKLDSVLIIVFNLTQVLIINAYICFYAGL--EI--M--KLNWLC

Tc-elov109 -----MTSLMHMVVENYNELM---ESKRDPVVDSWLFMSSPVPVVTILLVYLYFVLKLGPKLMEKREAFDLKGVLIQVLYQVLFSTWLVCCQAMTVKSA---LPHLLNHTC

Tc-elov110 -----MVNL--INSTQTTLTKIYDYEW-TLSLSDSRTKGPVLDSPGPTLLYTLIYLFV--VWIGPKLMKNRKPFRLTWLLIPYNLTMAVLNAYIAIQLLTASTR---L--RYSYIC

Tc-elov111 -----MAGLAEKYDYVM---NDLSDPRVKNWIFGSSPAMVLSIIALYLSIIYIFLPAYMKNRKPYDLKNIYYINIFQIVSCLVLIYGVATSGWT---T--TYSWGC

Tc-elov112 -----M--FOYADPRIENYFLMKSPLPVTLIMAFYTSFVFKIGPALMKNRQPMKLDRIIMVYNVWQIILNGVIFLMALR--EL--P--KLSIFC

Tc-elov113 -----MT-TSVQKFLDVLTD---PQISDVR--MNRFLMKSPLQLITTLGLYLATVLLIGPRLMRNRKPFSLKGTIVAYNVIQICWNLYLFLGFV--LS--N--NLSIVC

Tc-elov114 -----MT-SVLEHLVSGYSKL---VQWSDTRSRYFPMGSPLPITVLSVYFYIFDYGPKVMKNAKPDITNMAYNFFQVIFSAWLFYEFCASGWL---LW--N--DTKLLC

Tc-elov115 -----MDVSVRLFTDF---EKLGDPRVKNYTLMQTPLOPIVISTLYMLFILKIGPTLMKHREPLNLKYVMIAYNIVQIVANLVVVFVMAK--IV--P--LVNFLC

Tc-elov116 MSFWFHFIKILLTKFCHNLSKMLDYNYLI---YELEDPLIKNKPLLNSPFLAFATYLLLIYVVLPOYMKNEKPYKLTIIILYNLFQIVFCTYFVYQYLTPLSD---P--LVNWC

Tc-elov117 -----MNLHLHLYNYV---TECGDPRVKNWFLVQTPVPT-----LIIIGFTTPLSD---P--AFALKC

Tc-elov118 -----MKEYHQVTSPNYSYVFNESDFIHQETRTWMDKNWTL-GFYVGIYMV-LIFGGQHLMQNRPFELRGVLSLWNTLLATFSIIGACRTVPEFLHTLTHHGLYHSVC

Consensus

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

Ag-elov101 QPVDYSRNPVAMR-----MARAVMYYMCKVVELLDTVFFVLRKKQNOVSFLHVYHHTLMPVCGFVGVKVFAGGHGTLGINSFIHVCMYAYYMLAAMGPKVQKY

Tc-elov101 QPVDYSDNPMAIR-----MAQAVWLYFLCKIIELLDTVFFVLRKKMNQVTFLLHYHHAAMPICSWIGVKFLPGGHGTLGLINSFIHIMYSYFVSSMGPOYQKY-

Tc-elov102 QPVDYSNNKKALR-----MANLCWYIYISKLEFADTVFFVLRKKDSQVTLHLHYHSLTPLETWILVKFLAGGHGTFSNLINNMVHVIMYFYVMAAMGPEYQKY-

Tc-elov103 EPVDFSWSPHALR-----VARGVIFYLAKISELLDTVFFVLRKKNNQVSFLHYHHAAMPISWGVVYKMPGGHAIFIGFINSFVHIIMYTYLLAAMGPOYQKY-

Tc-elov104 QPVDYSRSPLAMRVSPKSGNLITRLMHXFLQMARGCWYIYFSKFEFLDTIFFVLRKKNDHISTLHVYHGHGIMPMSVWVGVKFTPGGHSTFFGFLNTFVHIIMYSYLLAALGPYQKY-

Tc-elov105 QPVDYSNSPMAIR-----MARTCWYIYFSKFEFFDTLFFILRKKNSHVSTLHVYHGHGMPFSVWVMGMKFAVGGHSTFFGFLNTFVHIIMYFYVMAAMGPEYQKY-

Tc-elov106 QPVDYSNKPSTIR-----MVHASWYIYFSKFEFLDTIFFVLRKKYDQVSTLHVYHGHGMPMSVWVGVKFTPGGHSTFFGFLNTFVHIIMYFYVMAAMGPEYQKY-

Tc-elov107 QPIDISANPRTMR-----MVNVTWYIYFSKFEFLDTIFFVLRKKYDQVSTLHVYHGHGMPMSVWVGVKFTPGGHSTFFGFLNTFVHIIMYFYVMAAMGPEYQKY-

Tc-elov108 APIDYSITPHNMF-----IMRLVYLYFLTKIADLMDTIFLLRGGTNQVSFLHVYHGHGMIIGLSWTGKFLGGGHSIFLGFVNTFVHTVMYFYLLTIWKPEYKGN-

Tc-elov109 -----RNPSTNK-----EFQFALANGAWYIYFSKIVEELLDTVFFVLRKKQSQVTFLLHYHHSCTMFFSWGYLKFPLGEGQVVIIGLLNSFVHVVMYTYLLAALGPRFQKY-

Tc-elov110 EPCRQRYHPDELQ-----IANAVWYIYFSKLEFLCDTFFFILRKKDRQLTFLLHYHHSCTMFLWVIGIKWVPSGSTFLPAMVNSAIHVLVMAAYYGLAALGPHIARY-

Tc-elov111 QPVDYSNNPQAIN-----MLHWCYIYFVFLKIEFLIETVFLRKKNFQVSKLHVYHASTFLLTWFVIGTKYVGGMSTFFIMINSVHLVHMVYTYLLAALGPEWQKYM

Tc-elov112 SPIDKSNHPDALA-----VLNLQYAYTMLKIFDLDLTVFFVLRKKHSQVTFLLHYHHTMMAVFSWITCKFFIGGQVFFLGLPNLFVHVVMYFYFLTSWDPYTRNS-

Tc-elov113 TPYEKSNRQEVLO-----MIELHYRIYLLKHFDLIETMFFVLRKKERQVSFLHVYHGHGILLAAVWVSGKYFPGGQATFVGLYNTFVHLVVMYCYLLSSYKS--SET-

Tc-elov114 TPITENI-----LVFPHYMYFLKAVDLIDTVFFVLRKRFDQITFLHVYHGHGIMLVGWSVTCNYFPGGQLYFLGFINSFVHAVMYLYYLLSLVDPYSYKS-

Tc-elov115 SPADNSTPA-----MLAAHCYIYLLKFLDLDLTVFFVLRKRQRVSYLHVHGHGMLASAWISGKYFPGGHALYLGFYNTFVHTIMYGYLLMTVCCPEYKGS-

Tc-elov116 DYFTYEDTPKSQR-----RSKICYVYLIKIAELVETVFFVLRKKYKQISGLHVYHHTSTLLLWVFLTKYSSGGVTAFFWMLNSGVHVMYTYLLVAVSLGFQRATNF

Tc-elov117 DFFTYNDSPKAQK-----RLMSYFHLKIVELFETVFFVLRKKFNQVSVLHVYHHTTMMITWLFTKYFA---AFSOMLSNFVHFMYCYLLVAVSLGPFVWQKI

Tc-elov118 VPSFIEQDKV-----SGFWTWMFVLSKLPGLDITFVLRKQ--PLIFLHWYHHTIVLLYSWFSYTEYTASA-RWIVMNYCVHVSVMYTYLLAVRAMGYSPPRQI

Consensus

. \* :: :\*::\*: \* : : \*\* \*\* : . \* :\* \*\* \*\* :



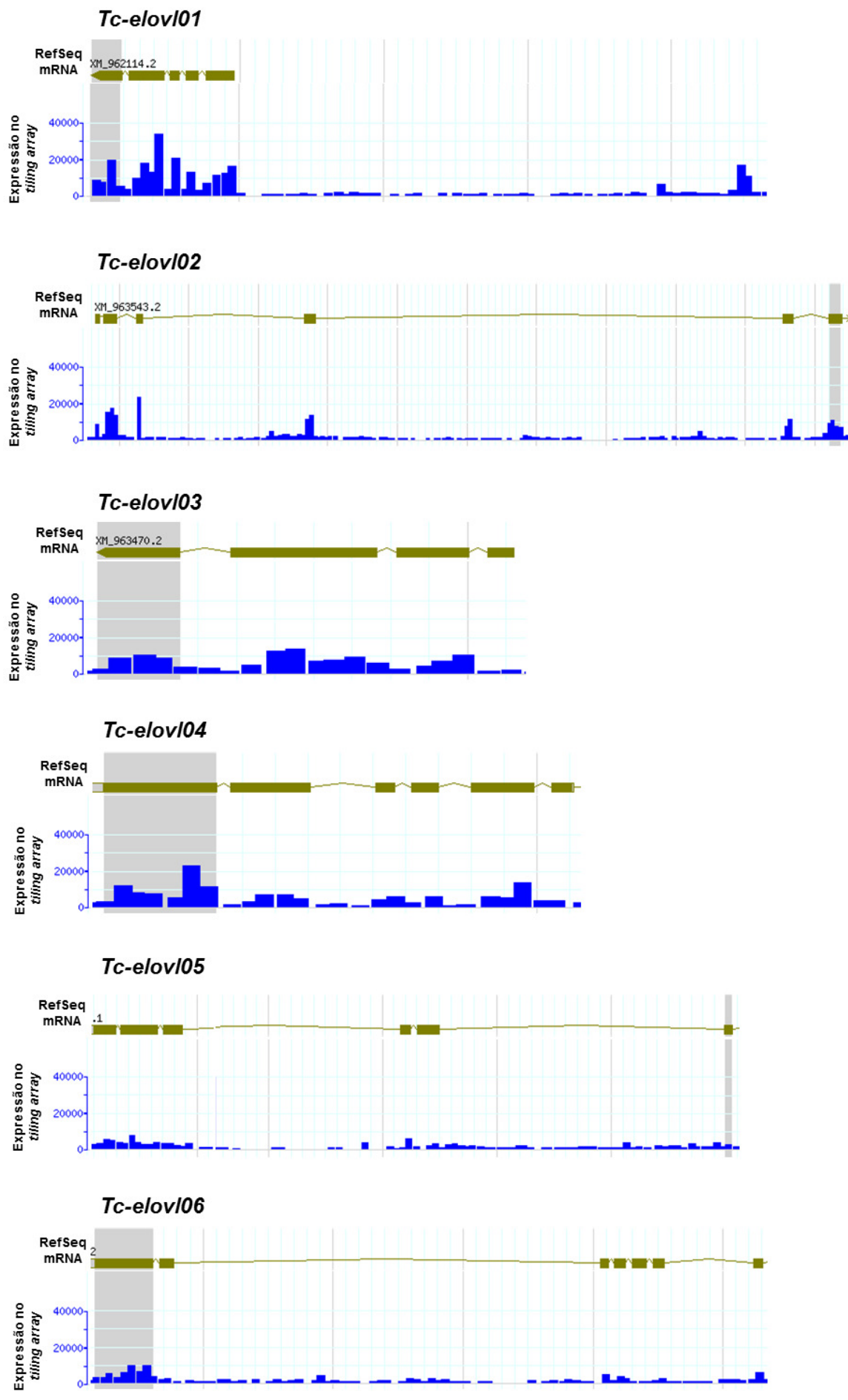


## 4.2. Inferências a partir do tiling array apontam que os genes *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04* podem ser expressos na serosa

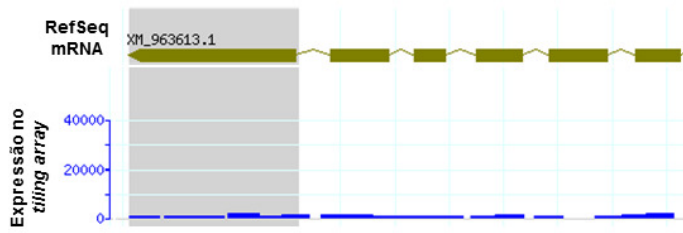
Para determinar se genes *elovl* de *T. castaneum* são expressos na serosa durante a formação da cutícula serosa, inicialmente foi realizada análise da expressão gênica *in silico*, a partir dos dados do *tiling array* disponibilizado na plataforma *BeetleBase3.0* (item 3.3). Neste banco de dados estão disponíveis informações de expressão gênica em apenas três momentos do desenvolvimento embrionário: 6, 14 e 30 horas. Aqui mostraremos os resultados pertinentes ao período de 14 horas de desenvolvimento, momento esse em que a cutícula serosa está sendo sintetizada (vide item 1.5, Introdução).

É necessário ressaltar que as sequências preditas das 18 ELOVL de *T. castaneum* estão melhor anotadas no banco de dados do NCBI do que no banco do *BeetleBase*. Além disso, o número de acesso das sequências disponibilizado pelo NCBI não são os mesmos encontrados no *BeetleBase*. Assim, para a correta localização da expressão gênica das 18 *Tc-elovl* no *tiling array* foi realizado um *tBlastn* (com alinhamentos sem espaço, *i.e.* a opção '*Perform ungapped alignment*' foi marcada) dentro do *BeetleBase* a partir das sequências de proteínas preditas das 18 Tc-ELOVL correspondentes obtidas no *GenBank*.

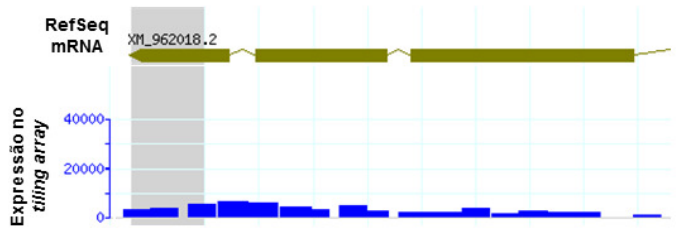
Dos 18 genes *Tc-elovl* apenas quatro apresentaram elevada expressão com 14 horas de desenvolvimento: *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04*; os demais genes *elovl* (*Tc-elovl05* até *Tc-elovl18*) apresentaram expressão residual ou não apresentaram expressão com 14 horas de embriogênese (Figura 12). Sendo assim, os quatro primeiros genes *Tc-elovl* foram considerados como possíveis candidatos a serem expressos na serosa para a síntese da cutícula serosa e o gene *Tc-elovl07* um possível candidato a controle negativo por não ser expresso neste momento da embriogênese.



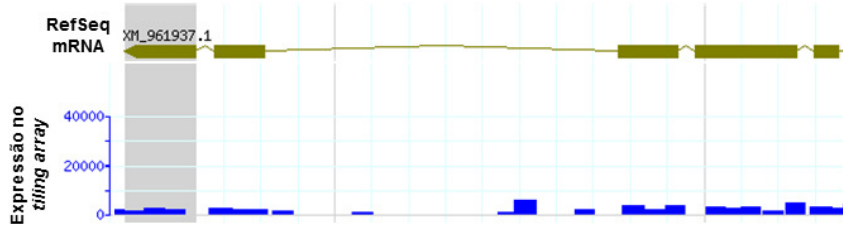
### *Tc-elov107*



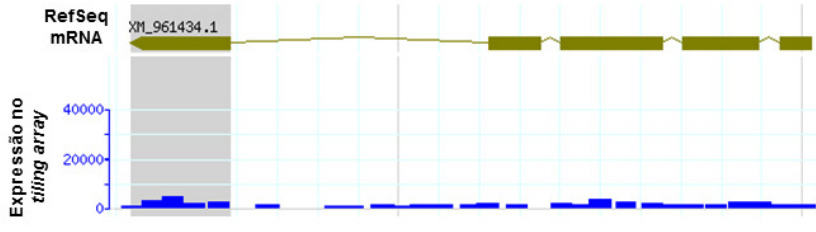
### *Tc-elov108*



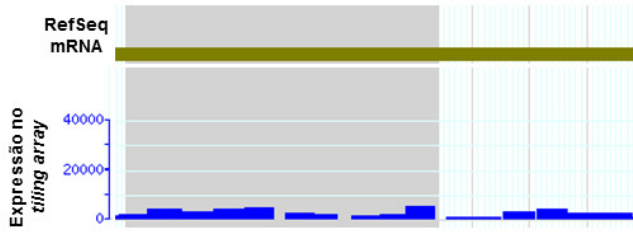
### *Tc-elov109*



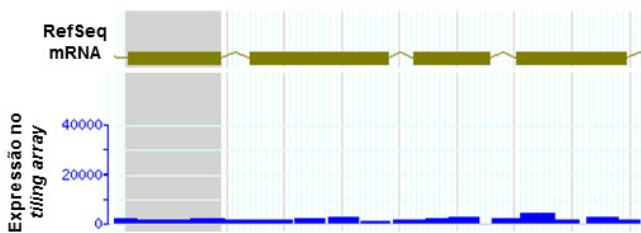
### *Tc-elov110*

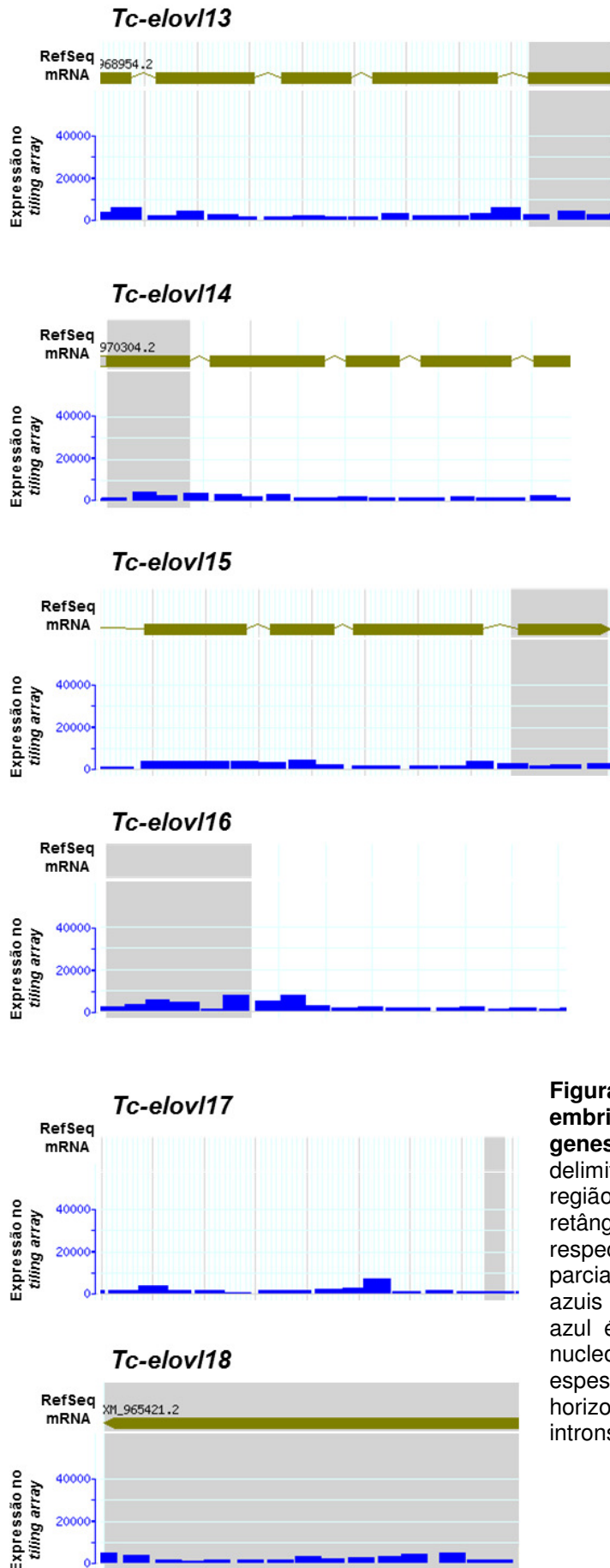


### *Tc-elov111*



### *Tc-elov112*



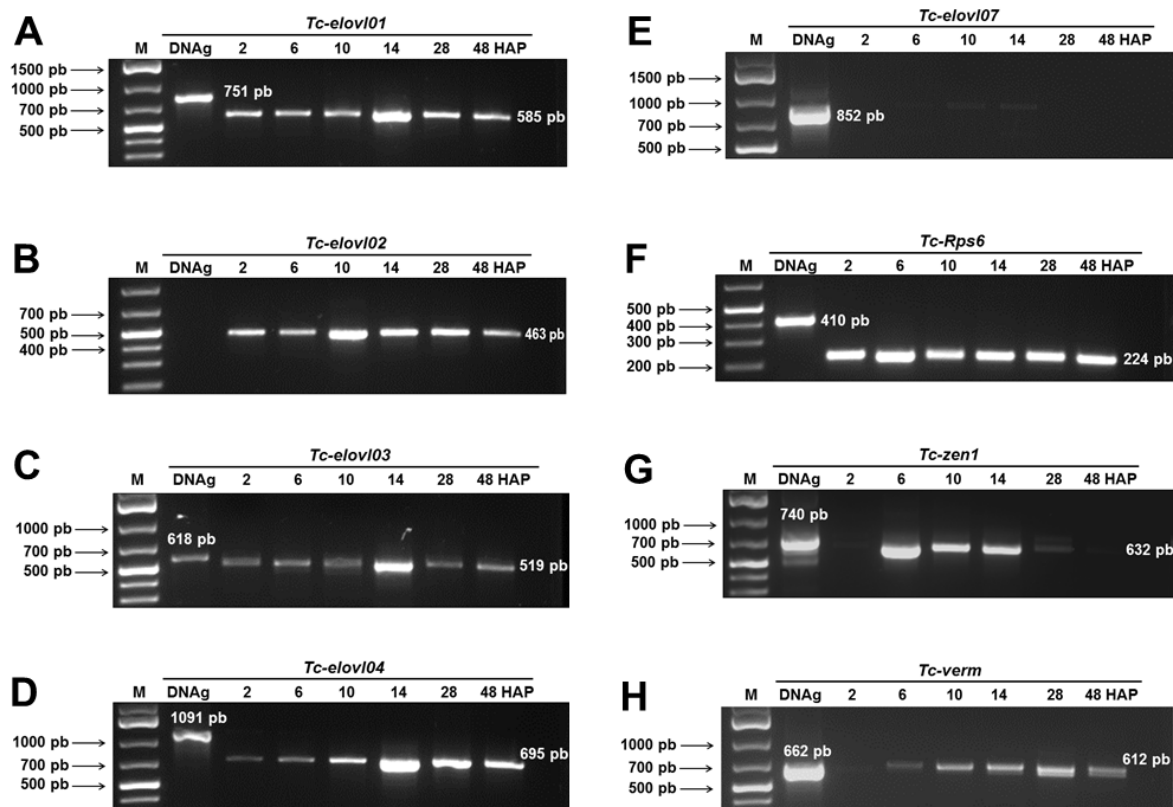


**Figura 13: Tiling arrays da expressão, com 14 horas de embriogênese, das regiões gênicas dos 18 parálogos de genes *elov1* de *T. castaneum*.** Cada região gênica foi delimitada pelas suas extremidades 5' e 3' contendo a região codificadora da proteína. Quando presentes, traços e retângulos em verde representam exons e introns, respectivamente, obtidos de sequências de mRNA (algumas parciais ou incompletas) presentes no BeetleBase. Barras azuis representam níveis de expressão gênica. Cada barra azul é uma sonda de tiling array composta de 50 a 65 nucleotídeos. As barras entre diferentes genes possuem espessuras distintas devido às diferentes escalas horizontais. O gene Tc-elov18 é o único que não possui introns.

### 4.3 Os genes *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04* são expressos na embriogênese inicial

Foram realizadas RT-PCRs a partir de mRNAs obtidos com 2, 6, 10, 14, 28 e 48 horas de embriogênese (o que equivale a aproximadamente metade do desenvolvimento embrionário total) e PCR com DNA genômico (Figura 14). Os genes *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03*, *Tc-elovl04* e *Tc-Rps6* são expressos em todos os momentos (Figura 14A-D, F). Apenas o DNA genômico de *Tc-elovl02* não foi amplificado, possivelmente devido ao seu elevado tamanho (7.727 pb). O gene *Tc-elovl07*, controle negativo, não é expresso durante a embriogênese (Figura 14E); a fraca expressão observada com 10 e 14 horas da embriogênese deve-se provavelmente a um mRNA não processado, pois possui o mesmo tamanho do amplicon obtido com DNA genômico. O gene *Tc-zen1* foi amplificado com 6, 10 e 14 horas do desenvolvimento e *Tc-verm* está presente a partir das 6 horas, parecendo ser mais expresso com 28 horas da embriogênese (Figura 14G, H). Todos os *primers* foram validados pelo sequenciamento dos amplicons resultantes (vide item 5.4 abaixo).

A presença constante dos amplicons de *Tc-Rps6* comprovou o sucesso da extração de RNA e da síntese de cDNA. Os padrões de expressão de todos os genes *Tc-elovl* validaram o perfil de expressão obtido *in silico* a partir dos experimentos de *tiling array*. A ocorrência de *Tc-zen1* entre 6 e 14 horas condiz com a sua expressão previamente descrita nas células da serosa. Além disso, o gene *Tc-zerknüllt1* (*Tc-zen1*) codifica o fator de transcrição responsável pela definição da serosa (Falciani *et al.* 1996, van der Zee *et al.* 2005). A aparição de *Tc-verm* na embriogênese tardia provavelmente está relacionada com seu papel na pigmentação dos olhos do embrião em desenvolvimento, sem afetar outros aspectos da embriogênese (Arakane *et al.* 2008).



**Figura 14: Expressão gênica na embriogênese de *T. castaneum*.** Foi realizada PCR com DNA genômico (DNAg) e RT-PCR com cDNAs obtidos a partir de 2, 6, 10, 14, 28 e 48 horas após a postura (HAP) para os genes: **A:** *Tc-elovl01*, **B:** *Tc-elovl02*, **C:** *Tc-elovl03*, **D:** *Tc-elovl04*, **E:** *Tc-elovl07*, **F:** *Tc-Rps6*, **G:** *Tc-Zen1* e **H:** *Tc-verm*. Para cada gene, o tamanho de banda esperado para o DNA genômico está indicado ao lado ou acima da respectiva banda e para o cDNA está indicado à direita da banda de 48 HAP. M: marcador de peso molecular.

#### 4.4. Todos os amplicons obtidos correspondem aos genes esperados

Conforme descrito no item 3.5, amplicons de todos os genes foram clonados e sequenciados para confirmar se eram de fato oriundos dos genes de interesse (Figura 15). Os *contigs* (sequência contígua definida por sobreposição de elementos comuns a pelo menos duas sequências) obtidos correspondem às sequências de nucleotídeos depositadas no banco de dados do NCBI para os mRNAs dos genes *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03*, *Tc-Rps6*, *Tc-zen1* e *Tc-verm*. O contig obtido para *Tc-elovl04* corresponde à sequência disponível no *GenBank* com exceção de um exon alternativo com 54 nucleotídeos a mais na versão do *GenBank*. O contig para *Tc-elovl07* é oriundo de um amplicon obtido com DNA genômico. As diferenças em relação às sequências de mRNA do *GenBank* devem-se à presença de íntrons. Em todos os *contigs* foram encontrados alguns poucos polimorfismos de nucleotídeo

único (*Single-nucleotide polymorphism* - SNPs). A partir destes resultados demos prosseguimento às hibridizações *in situ* a fim de verificar a expressão dos genes na região da serosa.



**Tc-*elovI01***

```
          250    260    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360
cont_E01  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ncbi_E01  -----CCTCACCATAAATGCGACCTATTTATATTT
consensus *****

          370    380    390    400    410    420    430    440    450    460    470    480
cont_E01  TTGTATCTACGCCGGCCCTCGTTACATGAAAGATAGGAAACCGTTCGATCTGAAAACGCGATAAATAGTCTACAATTTTTTACAAGTCATTTTCAGCATATCCTAGTTTATGAGGGCTT
ncbi_E01  TTGTATCTACGCCGGCCCTCGTTACATGAAAGATAGGAAACCGTTCGATCTGAAAACGCGATAAATAGTCTACAATTTTTTACAAGTCATTTTCAGCATATCCTAGTTTATGAGGGCTT
consensus *****

          490    500    510    520    530    540    550    560    570    580    590    600
cont_E01  GATGGGGGATGGGCAACAGGCTACAGCCTGAAATGCCAACCTGTGGATTACTCCGACAATCCTATGGCAATTCGGATGGCCCAAGCCGTGTGGTTGTATTTCCTCTGTAAAATAATCGA
ncbi_E01  GATGGGGGATGGGCAACAGGCTACAGCCTGAAATGCCAACCTGTGGATTACTCCGACAATCCTATGGCAATTCGGATGGCCCAAGCCGTGTGGTTGTATTTCCTCTGTAAAATAATCGA
consensus *****

          610    620    630    640    650    660    670    680    690    700    710    720
cont_E01  GCTGCTCGATACGGTGTTTTTCGTCTTGAGGAAGAAAATGAATCAGGTTACATTCCCTCCACCTGTACCATCACGCCATGATGCCGATCTGCTCATGGATCGGTGTGAAATTCCTGCGGG
ncbi_E01  GCTGCTCGATACGGTGTTTTTCGTCTTGAGGAAGAAAATGAATCAGGTTACATTCCCTCCACCTGTACCATCACGCCATGATGCCGATCTGCTCATGGATCGGTGTGAAATTCCTGCGGG
consensus *****

          730    740    750    760    770    780    790    800    810    820    830    840
cont_E01  AGGTCATGGCACTTTGCTGGGATTGATCAATTCCTTTATTACATAATAATGTACTCGTACTACTTCGTGTCTTCGATGGGGCCCCAGTACCAAAAATATCTGTGGTGAAGAAGCATT
ncbi_E01  AGGTCATGGCACTTTGCTGGGATTGATCAATTCCTTTATTACATAATAATGTACTCGTACTACTTCGTGTCTTCGATGGGGCCCCAGTACCAAAAATATCTGTGGTGAAGAAGCATT
consensus *****

          850    860    870    880    890    900    910    920    930    940    950    960
cont_E01  GACGGCAATGCAAATGGTGCAATTTTGCAATCTTTTCCATAATTTACAAGTGTGTTCCGGCAGTGTGATTA-----
ncbi_E01  GACGGCAATGCAAATGGTGCAATTTTGCAATCTTTTCCATAATTTACAAGTGTGTTCCGGCAGTGTGATTACCAAAGTTTATCGTAATGTGTTAGGTACACAAGCGCTGTTTT
consensus *****
```

**Tc-*elovI02***

```

        610      620      630      640      650      660      670      680      690      700      710      720
cont_E02  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_E02  -----GGCAAAC TTATGCTGGTGGTACTACATCTCGAAGCTAACAGAATTCGCTGATACAGTCTTCTTCGTGTTGCGCAAAAAAGACAGTCAAGTTACTCTACTCCACCTGTATCAT
consensus *****

        730      740      750      760      770      780      790      800      810      820      830      840
cont_E02  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_E02  CACAGCCTCACGCCCTTGAAACGTGGATTCTTGTGAAATTCCTTGCAGGTGGTCATGGCACGTTTTCCAACCTAATCAACAACATGGTCCATGTTATCATGTACTTTTATTACATGGTA
consensus *****

        850      860      870      880      890      900      910      920      930      940      950      960
cont_E02  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_E02  GCTGCGATGGGACCGGAATACCAAAGTATTTGTGGTGAAGAAACATCTTACCACCATTCAACTGGTGCAATTTGGGCTAGTGTTCATTCATTCCGCTCAGTTGCTCTTCACCGACTGT
consensus *****

        970      980      990      1000     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
cont_E02  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_E02  GGCTACCCTAGGTTTCATCGGAGCTTTCTCCTGCTTCACTCAGCGATCTTCTTCGCTCTGTTACACATTCTATTACCAAACATACAGTCGGAAGCAAAGTCGGTCAA-----
consensus *****
```

**Tc-*elovI03***

```
                250      260      270      280      290      300      310      320      330      340      350      360
cont_E03  -----TTGGAGATCCTCGGACAAACGATTGGTTTTTGGTGACCCATCCTGTGATTTTCCTA
ncbi_E03  AATGGCAAATGGAACGTAGATAAAACCTTTAAGGGGGTTTACCATTTCCTCTTCACAGAACCTTGGAGATCCTCGGACAAACGATTGGTTTTTGGTGACCCATCCTGTGATTTTCCTA
consensus *****

                370      380      390      400      410      420      430      440      450      460      470      480
cont_E03  TTGTGGTCTCTATTTGTATTTTGAACAAAACCCGGCCCTCGGCCAATGAAAGATCGTCCGCCTTTCGACTTTAAATTAATTTAATATATATAACGCTTTTCAAGTGTTTTAAGTA
ncbi_E03  TTGTGGTCTCTATTTGTATTTTGAACAAAACCTCGGCCCTCGGCTAATGAAAGATCGTCCGCCTTTCGACTTTAAATTAATTTAATATATATAACGCTTTTCAAGTGTTTTAAGTA
consensus *****

                490      500      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
cont_E03  TTTGGCTCTTTTGGGAAGCGCTGGAGGGAGCTTATTGGGACAAATACAGTTGGAAGTGTGAGCCTGTGGACTTTTCTTGGTCACTCATGCTTTAAGAGTGGCTCGAGGTGTTTATATCT
ncbi_E03  TTTGGCTCTTTTGGGAAGCGCTGGAGGGAGCTTATTGGGACAAATACAGTTGGAAGTGTGAGCCTGTGGACTTTTCTTGGTCACTCATGCTTTAAGAGTGGCTCGAGGTGTTTATATTT
consensus *****

                610      620      630      640      650      660      670      680      690      700      710      720
cont_E03  TCTATTTAACGAAAATATCTGAGCTCCTAGACACCGTATTTTTCGTTTTGCGAAAGAAGAACAATCAAGTGTGCTTTCTCCACTTGTATCACCACGCTGTGATGCCGATGATTAGCTGGG
ncbi_E03  TCTATTTAGCGAAAATATCTGAGCTCCTAGACACCGTATTTTTCGTTTTGCGAAAGAAGAACAATCAAGTGTGCTTTCTCCACTTGTATCACCACGCTGTGATGCCGATGATTAGCTGGG
consensus *****

                730      740      750      760      770      780      790      800      810      820      830      840
cont_E03  GAGTCGTGAAGTATATGCCAGGAGGGCATGCTATATTTATTGGGTTCAATTAATAGTTTCGTGCACATAATAATGTACACATATTACTTGCTTGCTGCAATGG-----
ncbi_E03  GAGTCGTGAAGTATATGCCAGGAGGGCATGCTATATTTATTGGGTTCAATTAATAGTTTCGTGCACATAATAATGTACACTTATTACTTGCTTGCTGCAATGGGACCCAGTTTCAAAAAT
consensus *****
```

**Tc-*elovI04***

```

      250      260      270      280      290      300      310      320      330      340      350      360
cont_E04   -----CGCTTACGGCGTTAAGGTAGTAGGCCCCAAATTGATGGAACAGGAGCCGTTCAATCTCAAATACACC
ncbi_E04   GGTTCCTGATGAGCTCGCCATCCCCACACTCCTCATCTGCTTGAAGCTACGCTTACGGCGTTAAGGTAGTAGGCCCCAAATTGATGGAACAGGAGCCGTTCAATCTCAAATACACC
consensus          *****

      370      380      390      400      410      420      430      440      450      460      470      480
cont_E04   TGATCTTCTATAATTTATCCAAGTTATATTAGCACGTACCTATTTTACGAGAGCGCGGTTGCGGGATGGATGAACCATTACAGCTTTAAATGCCAACCCGTGGACTACTCGAGGAGTC
ncbi_E04   TGATCTTCTATAATTTATCCAAGTTATATTAGCACGTACCTATTTTACGAGAGCGCGGTTGCGGGATGGATGAACCATTACAGCTTTAAATGCCAACCCGTGGACTACTCGAGGAGTC
consensus          *****

      490      500      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
cont_E04   CGCTGGCCATGAGAA-----TGGCCAGAGGATGCTGGTGGTACTACTTCTCCAAGTTCACAGAATTCCTTG
ncbi_E04   CGCTGGCCATGAGAGTCCGAAAGTCCGAAACTTAATCACACGTTTGATGCATNNTTTTTACAGATGGCCAGAGGATGCTGGTGGTACTACTTCTCCAAGTTCACAGAATTCCTTG
consensus          *****

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700      710      720
cont_E04   ACACGATATTTTCGTTTTGCGGAAGAAAACGATCACATATCGACCCTGCACGTGATCCACCACGGCATCATGCCCATGAGCGTGTTGCGGGTGAAGTTCACCCCCGGGGCCACT
ncbi_E04   ACACGATATTTTCGTTTTGCGGAAGAAAACGATCACATATCGACCCTGCACGTGATCCACCACGGCATCATGCCCATGAGCGTGTTGCGGGTGAAGTTCACCCCCGGGGCCACT
consensus          *****

      730      740      750      760      770      780      790      800      810      820      830      840
cont_E04   CCACCTTCTTCGGCTTTTGAACACTTTTGTGCACATCATCATGTACTCTTACTACTTGATCGCAGCGCTGGGGCCCCAGTACCAGAAGTACTTGTGGTGAAGAAGTACCTCACCACCA
ncbi_E04   CCACCTTCTTCGGCTTTTGAACACTTTTGTGCACATCATCATGTACTCTTACTACTTGATCGCAGCGCTGGGGCCCCAGTACCAGAAGTACTTGTGGTGAAGAAGTACCTCACCACCA
consensus          *****

      850      860      870      880      890      900      910      920      930      940      950      960
cont_E04   TACAGATGATCCAATTCGTCCTGGTTCATGGTGACGCGTTCCAACTCCTCTTCATCGACTGCAACTACCCTAAGGCCCTTCGTGTGGTGGATTGGATTGCACGCCGTTATGTTCTACTTCC
ncbi_E04   TACAGATGATCCAATTCGTCCTGGTTCATGGTTCACGCGTTCCAACTCCTCTTCATCGACTGCAACTACCCTAAGGCCCTTCGTGTGGTGGATTGGATTGCACGCCGTTATGTTCTACTTCC
consensus          *****

      970      980      990      1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
cont_E04   TCTTCTCCAACCTTCTACAAGCAAACCTTACGTGAAAAAAGACAAGAAGAAGGTCAGATCAGATGACCACCAGGACGAAG-----
ncbi_E04   TCTTCTCCAACCTTCTACAAGCAAACCTTACGTGAAAAAAGACAAGAAGAAGGTCAGATCAGATGACCACCAGGACGAAGAAGTGAAGACGAAGAGGTCGAATATTGGGATTTGTTTCACCA
consensus          *****

```

**Tc-*elovI07***

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
cont_E07  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ncbi_E07  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
consensus CCAAGAACTTCAAACGGTTTCTTATGTCAAGTCCAGGCCCTACTGTTGCCGTTTGTCTTAGCTATGTTCTTGTAAAGGTATGAATCTGCATAAAAACATGCCTAACCTAAACTTAT
      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
cont_E07  TTTTATGTAAAGTTTGTAGGTCCCAAAGTAATGGAAAAAAGAATCCATACAGTCTTAGAAAAATACTAATGGCTTATAATTTTTTCAAGTAATTTTGTAGTCTGGCTATTTTACGAA
ncbi_E07  TTTC TTGTAAAGTTTGTAGGTCCCAAAGTAATGGAAAAAAGAATCCATT CAGTCTTAGAAAAATACTAATGGCTTATAATTTTTTCAAGTAATTTTGTAGTCTGGCTATTTTACGAA
consensus *** *****
      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
cont_E07  GTAAGAAACCAAGTTAATGTTCCAATAAAAACTGTAACAATTTTGTAGTTTGTGCAAGTGGTGGTTAACCGGTGAATATAGTTTTCGATGTCAACCAATGGTATCTCCGCCAATC
ncbi_E07  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
consensus TTTTGTGCAAGTGGTGGTTAACCGGTGAATATAGTTTTCGATGTCAACCAATGATACTCCGCCAATC
      370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
cont_E07  CAAGAACTATGAGAGTAGGTACCTACAATTTTTGCAAAAATAAGAAATGTTGAACGAATTTGTTTATAGATGGTGAACGTCACCTGGTGGTATTTTTTCTCAAAGTTTACAGAAGTGG
ncbi_E07  CAAGAACTATGAGAAATGG-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
consensus ***** * * TGAACGTCACCTGGTGGTATTTTTTCTCAAAGTTTACAGAAGTGG
      490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
cont_E07  TCGAAACTGTAAGTCGTAATAATTATTTTATTATGATGATTTGCCAAAATTTAGATATCTTCATTATGAGGAAAAAATTTAATCAAGTGAATGCACTACATGTGTTCCACCATGGCA
ncbi_E07  TCGAAA-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
consensus ***** CTATATCTTCATTATGAGGAAAAAATTTAATCAAGTGAATGCACTACATGTGTTCCACCATGGCA
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
cont_E07  TTATGCCCGTCTCTGCTTGGGTAGCCACCAATACTATCCAAGTAAGTTTGTATTTTTTGTGATTTTTGTTTGTCTTGTTTTTATCTTATTTGGTTTATTTAGACGGACATGGAAC
ncbi_E07  TTATGCCCGTCTCTGCTTGGGTAGCCACCAATACTATCCA-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
consensus ***** AACGGACATGGAAC
      730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
cont_E07  GTTTCCCGGATTATTAATACTTTTGTACATGTTATAATGTATTTCTTATTTACTTCTTGAGCGCTTTTGGGCCAGAGGTGCAGAAATTTATGGTGAAGAAGTATTTAACAAGACTACA
ncbi_E07  GTTTCCCGGATTATTAATACTTTTGTACATGTTATAATGTATTTCTTATTTACTTCTTGAGCGCTTTTGGGCCAGAGGTGCAGAAATTTATGGTGAAGAAGTATTTAACAAGACTACA
consensus *****
      850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
cont_E07  AATGATTCAATTTGTTATAATAATGTTCCACGCCCTTGC-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ncbi_E07  AATGATTCAATTTGTTATAATAATGTTCCACGCCCTTGC-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
consensus *****

```

# Tc-Rps6

```

                250      260      270      280      290      300      310      320      330      340      350      360
                |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cont_Rps6      -----C
ncbi_Rps6      CAGGGTGTTCACGAACAGCCGCGTTCGCCTTCTCCTCTCAAAGGGCCACTCCTGCTACAGACCCCGGCGTGACGGTGAAAGGAAACGCAAGTCAGTTAGAGGGTGCATCGTCGACGGC
consensus
                370      380      390      400      410      420      430      440      450      460      470      480
                |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cont_Rps6      AACTTGAGTGTGCTTGCCCTCGTTATCGTGCCTAAAGGCGAACAGGAAATCCCTGGATTGACTGACACCACAGTCCCAGCGCGGCGTTGGGACCCAAAAGAGCATCAAATATTAGAAAACCTT
ncbi_Rps6      AACTTGAGTGTGCTTGCCCTCGTTATCGTGCCTAAAGGCGAACAGGAAATCCCTGGATTGACTGACACCACAGTCCCAGCGCGGCGTTGGGACCCAAAAGAGCATCAAATATTAGAAAACCTT
consensus      *****
                490      500      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
                |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cont_Rps6      TTCAATTTGAGCAAAGAAGACGACGTTTCGTTCAGTATGTGGTGAAGCGCCCTTGCCCCAGAAAGAGGGCAAGAAGCAGCGCTTCAAGGCACCCAAAATCCAGC-----
ncbi_Rps6      TTCAATTTGAGCAAAGAAGACGACGTTCCGTTCAGTATGTGGTGAAGCGCCCTTGCCCCAGAAAGAGGGCAAGAAGCAGCGCTTCAAGGCACCCAAAATCCAGCGCTTGATCACCAGTT
consensus      *****
```

**Tc-zen1**

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110     120
cont_zen1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_zen1  -----AAGCCGTTCTGCAGTCGTATAAATTTTCTGCAAGAAAAACAACCTTACGAGTATTACGAGAATAACCAA
consensus  *****

      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
cont_zen1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_zen1  GCTCTACCACCAATAACTTATCCACCTTCTGATTGGAACGTCCCAGTACAACGCGCCCTTACATGTCATCAGTGCCTCAGCTACCAACAGTAACAGAAATCAAGAACTCAACCC
consensus  GCTCTACCACCAATAACTTATCCACCTTCTGATTGGAACGTCCCAGTACAACGCGCCCTTACATGTCATCAGTGCCTCAGCTACCAACAGTAACAGAAATCAAGAACTCAACCC
*****

      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
cont_zen1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_zen1  CAACGGACCAAACCCACCGCTGAAAGCGTGCCCGCACTGCCTACACCTCGGCCAATTAGTGGAAATAGAGCGGGAATCCACCACGGGAAATACTTATCAGACCACGCCGAATCCAA
consensus  CAACGGACCAAACCCACCGCTGAAAGCGTGCCCGCACTGCCTACACCTCGGCCAATTAGTGGAAATAGAGCGGGAATCCACCACGGGAAATACTTATCAGACCACGCCGAATCCAA
*****

      370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
cont_zen1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_zen1  ATCGCCGAGAACCTGAACCTGAGTGAGCGTCAGATCAAGATTTGGTTCCAAAATCGCAGAATGAAGCACAGAAAGAACAGATGAACAAAGTTTCGACTCCGAGGTCCTCTCCTGCTGAA
consensus  ATCGCCGAGAACCTGAACCTGAGTGAGCGTCAGATCAAGATTTGGTTCCAAAATCGCAGAATGAAGCACAGAAAGAACAGATGAACAAAGTTTCGACTCCGAGGTCCTCTCCTGCTGAA
*****

      490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
cont_zen1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_zen1  ACAGCCTCGTCTCTTTCCGCCGAGTCGGTCGCCAGCACCGCTTCATCCGCCGATCACCAAATGTTGACCGCTTGTGTGCCACGCTCCCATCGACAGTGCAAACCAATGGTACAGCCAA
consensus  ACAGCCTCGTCTCTTTCCGCCGAGTCGGTCGCCAGCACCGCTTCATCCGCCGATCACCAAATGTTGACCGCTTGTGTGCCACGCTCCCATCGACAGTGCAAACCAATGGTACAGCCAA
*****

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
cont_zen1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ncbi_zen1  GCCGTTGATAACAGTTATCAGTTCTGTGATAAATTGCAATACACTTTTGATAACCAATGTTCCGGGCACGATTGACTGGGCTTTG-----
consensus  ACCATTGATAACAGTTATCAGTTCTGTGATAAATTGCAATACAGTTTTGATAACCAATGTTCCGGGCACGATTGACTGGGCTTTGCCCAAACAAGAGGACTGTTTTTATCAGGAAGGGTGG
** *****
```

**Tc-verm**

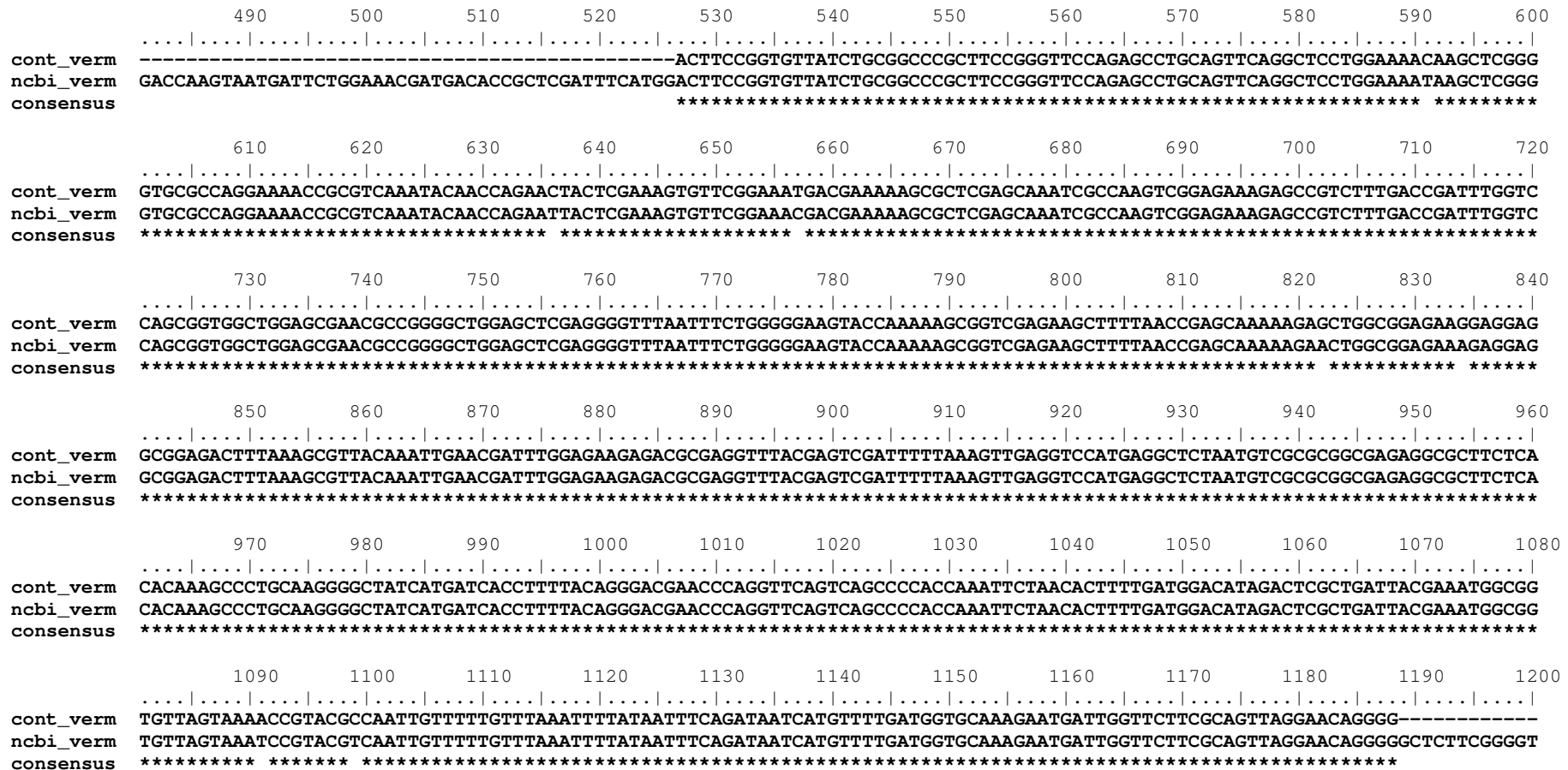
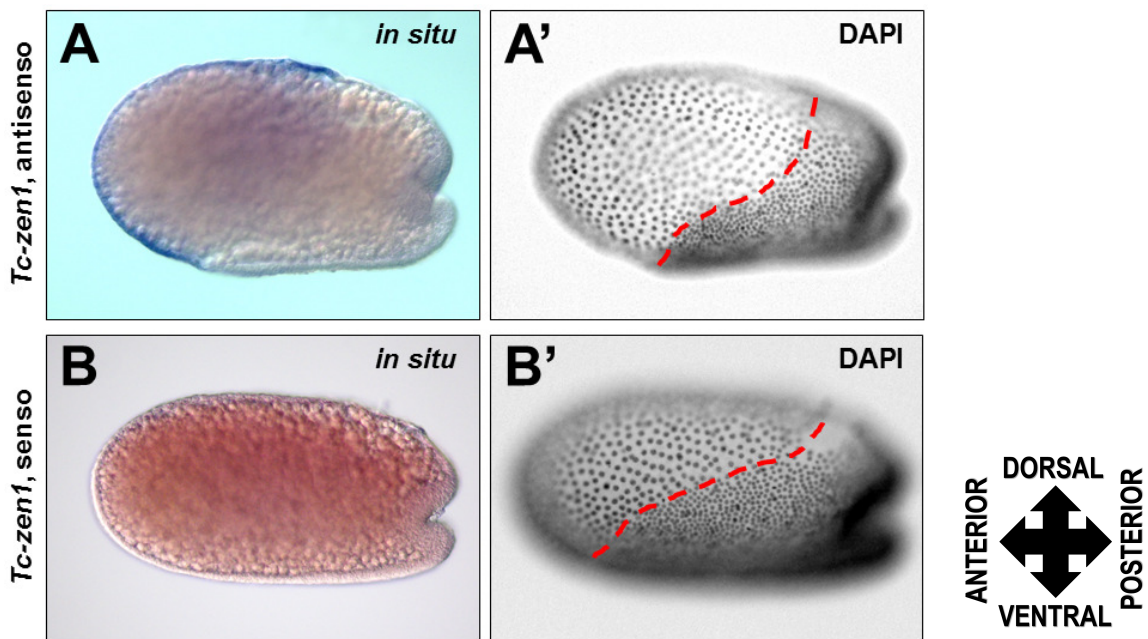


Figura 15: Alinhamento dos contigs dos genes sequenciados com as sequências disponíveis no GenBank do NCBI. Alinhamento realizado no programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A numeração acima do alinhamento refere-se às sequências do GenBank. A linha consensus indica os nucleotídeos idênticos (\*).



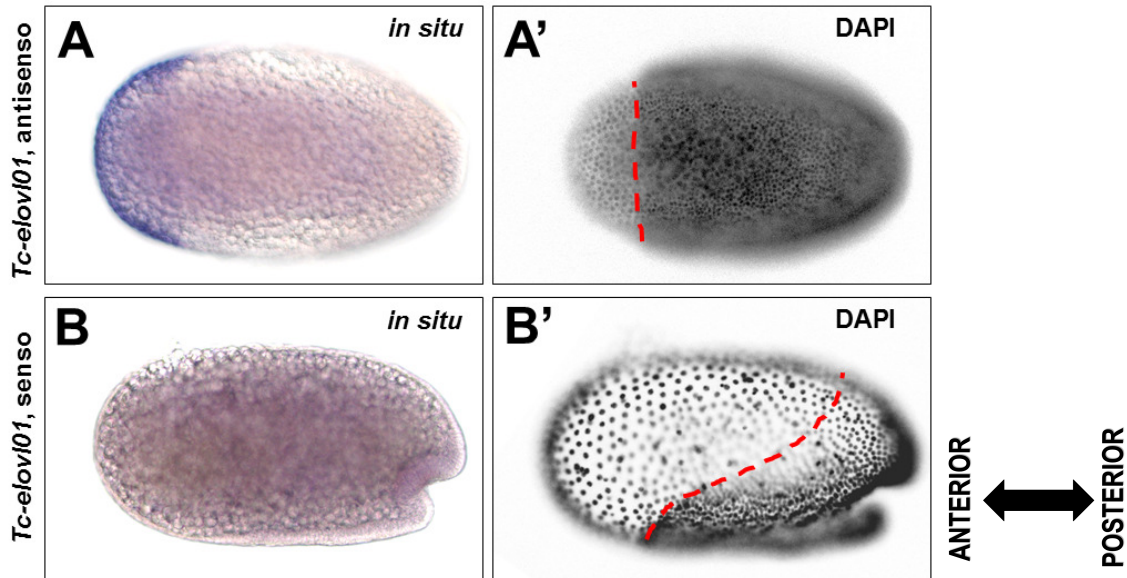
#### 4.5 Os genes *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04*, mas não o gene *Tc-elovl07*, são expressos na serosa

Visando confirmar a expressão dos genes *Tc-elovl* na serosa de *T. castaneum* foram realizadas hibridizações *in situ* colorimétricas com ovos entre 10 e 14 horas de idade (item 3.8). Com o propósito de estabelecer o protocolo de hibridização *in situ* no laboratório realizamos primeiro experimentos com o gene *Tc-zen1*. Este gene serviu como controle padrão uma vez que é expresso única e exclusivamente na serosa de *T. castaneum* (Falciani *et al.* 1996) (Figura 16). Enquanto ovos hibridizados com a sonda antisense para *Tc-zen1* apresentaram marcação específica, em roxo bem escuro na região da serosa (Figura 16A), a sonda senso para *Tc-zen1* não revelou qualquer marcação específica (Figura 16B). Após a confirmação do estabelecimento deste protocolo prosseguimos com os genes *Tc-elovl*.



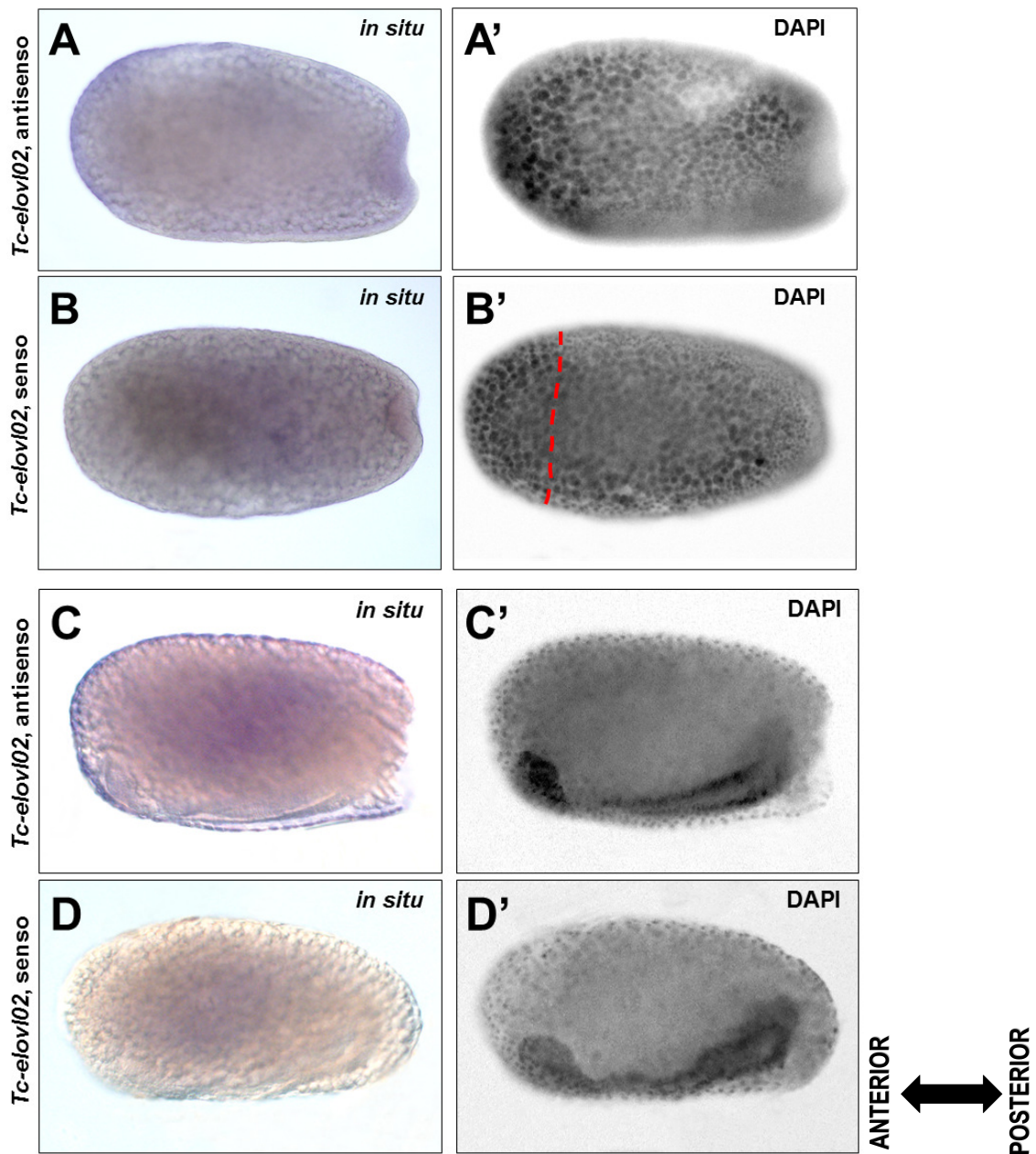
**Figura 16:** Hibridizações *in situ* para *Tc-zen1* e marcação com DAPI em ovos de *T. castaneum*. **A e B:** *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração avermelhada é background). **A' e B':** DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda). **(A e A')**: sonda antisense com expressão específica de *Tc-zen1* na serosa. **(B e B')**: sonda senso para *Tc-zen1* não apresenta marcação.

A expressão de *Tc-elov101* ocorre exclusivamente na serosa (Figura 17). A região central do ovo revela uma coloração mais fraca, possivelmente a marcação dorsal da serosa do lado oposto.



**Figura 17:** Hibridizações *in situ* para *Tc-elov101* e marcação com DAPI em ovos de *T. castaneum*. **A e B:** *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração vermelha é background). **A' e B':** DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda). Em **A e A'** o embrião está em posição ventral. Em **B e B'** a região dorsal está para cima. (**A e A'**): sonda antisense com expressão específica de *Tc-elov101* na serosa. (**B e B'**): sonda senso para *Tc-elov101* não apresenta marcação.

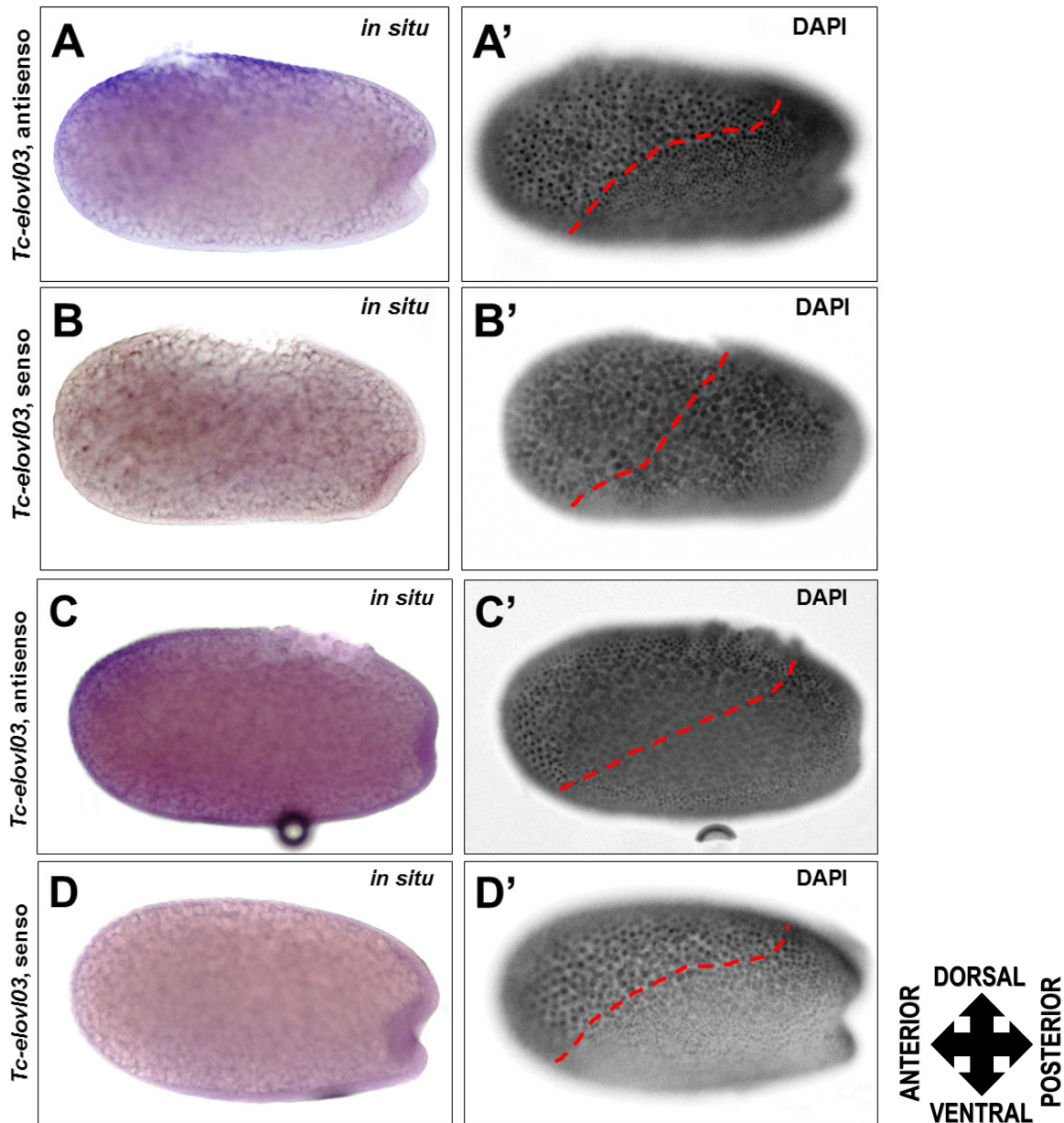
O gene *Tc-elov102* apresenta um padrão de marcação diferente (Figura 18). Ovos no início da gastrulação apresentam fraca expressão de *Tc-elov102* na região da serosa e, possivelmente, na região do poço primitivo (Figura 18A, B). Em estágio mais avançado do desenvolvimento, quando a serosa já envolveu o embrião por completo, a expressão do gene *Tc-elov102* é mais forte na serosa, sem nenhuma expressão no embrião (Figura 18C, D).



**Figura 18:** Hibridizações *in situ* para *Tc-elov102* e marcação com DAPI em ovos de *T.castaneum*. **A, B, C, D:** *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração vermelha é *background*). **A', B', C', D':** DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A marcação com DAPI na imagem **A'** não ficou clara, porém o embrião encontra-se no estágio similar ao que é visto na figura 20A'. Na imagem **B'** a linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda). Em **C'** e **D'** a serosa envolve o embrião por completo (vide figura 5D da introdução).. Em **A'** e **B'** o polo anterior está para a esquerda e dorso para cima; em **C'** e **D'** a serosa circunda o embrião por completo. (**A** e **A'**): sonda antisense de *Tc-elov102* com fraca marcação na serosa. (**B** e **B'**): sonda senso para *Tc-elov102* com fraca marcação roxa não específica. (**C** e **C'**): sonda antisense de *Tc-elov102* com forte marcação específica na serosa. (**D** e **D'**): sonda senso para *Tc-elov102* com *background* apenas na região central.



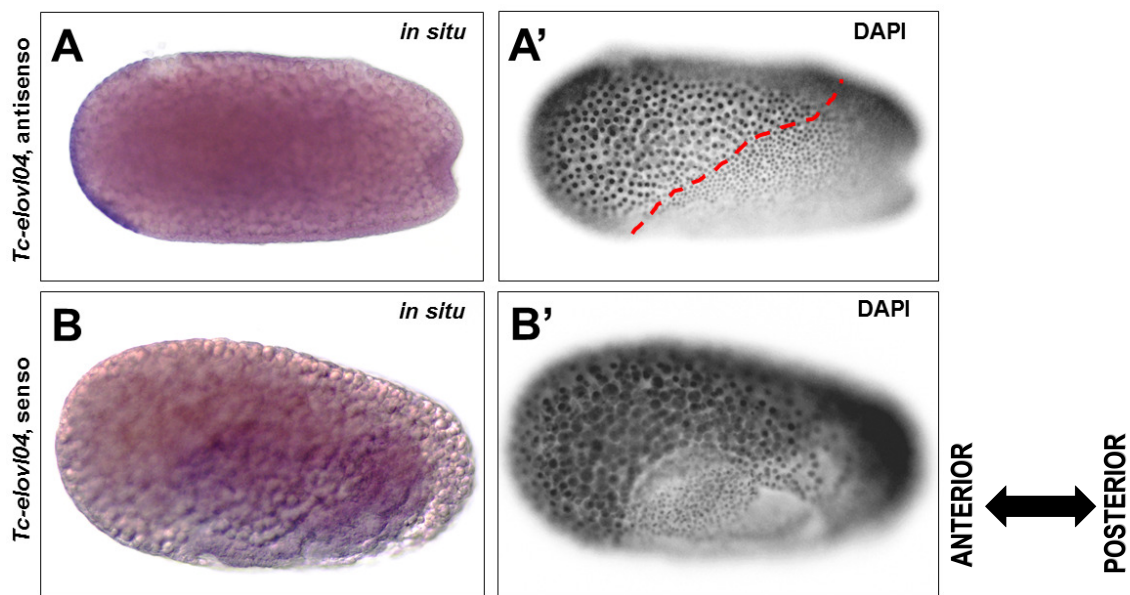
Em relação ao gene *Tc-elov103* em alguns ovos é possível detectar forte marcação apenas na região dorsal da serosa (Figura 19A, B). Outros ovos possuem expressão de *Tc-elov103* em toda a serosa mas também na região do primórdio embrionário na parte posterior do ovo (Figura 19C).



**Figura 19: Hibridizações *in situ* para *Tc-elov103* e DAPI em ovos de *T.castaneum*. A, B, C, D: *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração avermelhada é *background*). A', B', C', D': DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda) Em todos os painéis o polo anterior está para a esquerda. A', C', D': o dorso está para cima. B': o embrião está em posição dorso-lateral. (A e A'): sonda antisense de *Tc-elov103* com forte marcação na região dorsal da serosa. (B e B'): sonda senso para *Tc-elov103* sem marcação. (C e C'): sonda antisense de *Tc-elov103* com**

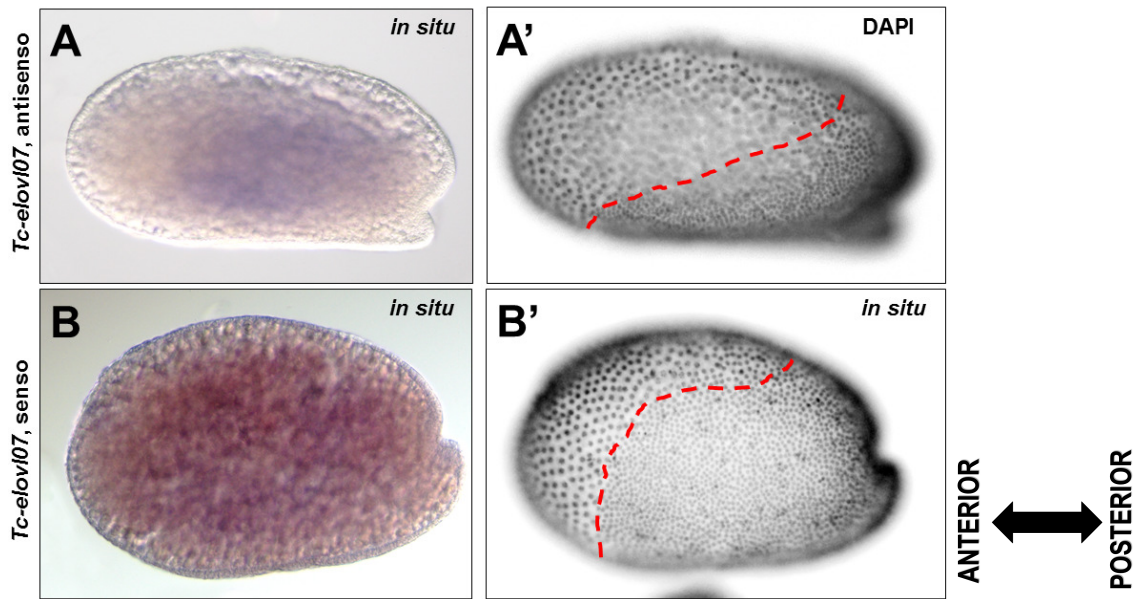
marcação na serosa e primórdio embrionário. (**D** e **D'**): ovos marcado com sonda senso para *Tc-elovl03* com tênue marcação inespecífica no primórdio embrionário.

O gene *Tc-elovl04* é expresso na serosa de *T. castaneum* (Figura 20A). Ovos marcados para a sonda senso em estágio embrionário um pouco mais avançado apresentaram marcação roxa não específica na região embrionária (Figura 20B).



**Figura 20: Hibridizações *in situ* para *Tc-elovl04* e DAPI em ovos de *T. castaneum*. A e B: *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração avermelhada é *background*). A' e B': DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda) no painel A'. No painel B' a serosa envolve o embrião quase que por completo (vide figura 5D da introdução). Em A e A' a região dorsal está para cima. Em B e B' a vista frontal do embrião é a parte ventro-lateral (A e A'): sonda antisense com expressão específica de *Tc-elovl04* na serosa. (B e B'): sonda senso para *Tc-elovl04* com fraca marcação roxa não específica.**

A detecção colorimétrica por hibridização *in situ* de *Tc-elovl07* comprovou que este gene não é expresso na serosa (Figura 21). A marcação roxa vista com a sonda antisense é *background* da técnica e não expressão do gene, como pode ser comprovado com a marcação com a sonda senso (Figura 21B).



**Figura 21: Hibridizações *in situ* para *Tc-elov107* e DAPI em ovos de *T. castaneum*. A e B: *in situ* (coloração roxa indica marcação específica, coloração vermelha é *background*). A' e B': DAPI (cada ponto preto é um núcleo celular). A linha tracejada vermelha delimita a região da serosa (voltada para a esquerda) no painel. Em B e B' vista frontal do embrião é a parte ventro-lateral (A e A'): sonda antisenso sem expressão específica de *Tc-elov107* na serosa. (B e B'): sonda senso para *Tc-elov107* sem marcação específica. Como a fraca marcação roxa está presente tanto em A quanto em B, trata-se de *background*.**

## 5. DISCUSSÃO

Os seres vivos habitaram inicialmente o ambiente aquático. Ao longo da evolução alterações abióticas ocorreram na Terra que possibilitaram a entrada dos procariotos no meio terrestre, há cerca de 1 bilhão de anos. Este grupo dominou o ambiente terrestre até a terra ser colonizada por fungos e plantas, aproximadamente 475-500 milhões de anos atrás. O balanço hídrico é um dos principais componentes para a manutenção da homeostase nos organismos vivos. A indisponibilidade de água gera impactos tanto na fisiologia do indivíduo, quanto para a riqueza e distribuição de espécies (Chown *et al.* 2011). Assim a entrada no meio terrestre acarretou custos aos organismos que passaram a ocupá-lo e que buscaram estratégias para burlar as adversidades de habitar um ambiente com pouca disponibilidade de água. Os primeiros grupos de plantas que se estabeleceram na terra, por exemplo, apresentavam um maior número de esporos e eram mais resistentes ao seco. Pteridófitas minimizaram o impasse do meio graças aos tecidos vasculares com parede celular rica em lignina que conferem maior suporte às plantas fora da água. Nos vertebrados terrestres (répteis, aves e mamíferos), a formação do ovo amniótico possibilitou a independência do grupo perante o ambiente aquático nas fases iniciais do ciclo de vida (Ridley 2004). Além disso, a invasão do ambiente terrestre pelas plantas, insetos e vertebrados também é creditada a formação de uma epiderme rica em lipídios de cadeia muito longa que minimiza a perda de água e os custos de habitar um ambiente seco (Hadley 1980).

Dentre os artrópodes, o grupo dos insetos foi o que apresentou maior êxito em ocupar o ambiente terrestre, sendo capaz de invadir diferentes nichos e se diversificar (Grimaldi & Engel 2005); ao contrário das espécies do seu grupo-irmão Crustacea (Misof *et al.* 2014), que na maior parte limitaram-se ao meio aquático (Brusca & Brusca 2007). Os insetos foram capazes de superar a deficiência hídrica do ambiente terrestre graças a um conjunto de características como: i) a existência de um exoesqueleto rígido e parcialmente impermeável capaz de minimizar a perda de água, ii) um sistema respiratório traqueal eficiente e bem ramificado que realiza o transporte gasoso diretamente

para as células e iii) um sistema reprodutor internalizado, que garante o transporte de gametas independente do ambiente aquático, ao contrário do que ocorre em outros invertebrados e anfíbios (Ridley 2004, Grimaldi & Engel 2005, Klowden 2007). Além destas características, alterações na estrutura dos ovos também facilitaram a estabilização dos insetos no meio terrestre (Zeh *et al.* 1989). A formação de uma casca de ovo estruturalmente mais complexa garantiu maior proteção contra choques mecânicos, ação de patógenos e o estresse hídrico; diferente do que é observado em outros artrópodes. Isso possibilitou aos insetos explorarem diversos sítios de oviposição (Hinton 1981, Margaritis 1985).

Em alguns artrópodes, como quelicerados, crustáceos e hexápodos não insetos, ocorre a formação de apenas uma membrana extraembrionária que recobre parcialmente os embriões. Estes grupos limitaram-se apenas a ambientes aquáticos ou úmidos. Acredita-se que em insetos a formação de duas membranas extraembrionárias (serosa e âmnio) que revestem por completo os embrião também contribuiu para a presença dos insetos no meio terrestre (Zeh *et al.* 1989, Panfilio 2008, Jacobs *et al.* 2013). Assim, o surgimento de estruturas que conferem maior proteção aos ovos em desenvolvimento possibilitou a ausência do cuidado parental abrindo caminho para um maior número de gerações e maior produção de indivíduos a cada oviposição (Zeh *et al.* 1989).

Como explicitado no item 1.4, a serosa desempenha diferentes funções durante a embriogênese, dentre as quais secretar a cutícula serosa. Embora tal estrutura garanta resistência dos ovos à dessecação sua composição ainda é pouco compreendida (Rezende 2008, Rezende *et al.* 2008, Jacobs *et al.* 2013, Vargas *et al.* 2014). O presente trabalho teve por objetivo avaliar a presença de genes *elovl* na serosa do besouro *Tribolium castaneum*, uma vez que podem estar relacionados com a formação e composição da cutícula serosa.

Os genes *elovl* pertencem à família das elongases, encontradas em eucariotos, de fungos a vertebrados, e bem conservada nesses grupos. O número de genes presentes no genoma varia de acordo com o organismo. Fungos e mamíferos possuem em seu genoma, respectivamente, três e setes genes *elovl* (Leonard *et al.* 2004, Jakobsson *et al.* 2006). Em plantas, cerca de 20 genes de elongases são encontrados (Joubes *et al.* 2008). Em busca



realizada no NCBI, identificamos que as espécies *Ae. aegypti*, *A. mellifera* e *D. melanogaster*, de maneira geral, apresentam também um elevado número de genes *elovl* em seu genoma, em torno de 20 (dados não mostrados). Neste trabalho foram encontrados 18 parálogos de *elovl* no genoma do besouro *T. castaneum*. As análises de bioinformática deste trabalho basearam-se nos bancos de dados do *BeetleBase* e do *Genbank*. Observamos incongruências entre sequências anotadas nas duas plataformas. Algumas sequências de *Tc-elovl* do *GenBank* não são encontradas na versão 3.0 do genoma de *T. castaneum* presente no *BeetleBase*. Éxons de algumas *elovl* não estão anotados e dois genes contíguos foram anotados como sendo um só. Outras investigações do grupo também observaram que o gene *grainyhead* está erroneamente anotado no *BeetleBase* (Rezende e Menezes, comunicação pessoal).

A presença de mais parálogos *elovl* em um determinado genoma sugere que possam atuar em momentos distintos do desenvolvimento, em diferentes tipos celulares ou ainda em diferentes contextos fisiológicos. Os VLCFA (produzidos pelas elongases, vide item 1.6) estabilizam microdomínios de membrana plasmática (*lipid rafts*), possibilitando a presença de proteínas específicas (Gaigg *et al.* 2006). Em peixes genes *elovl* são expressos na região da cabeça e na camada sincicial do vitelo e os VCFLA auxiliam na formação de diferentes tecidos durante o desenvolvimento embrionário (Monroig *et al.* 2009, Monroig *et al.* 2011). Em mamíferos os genes *elovl* estão presentes no fígado, epiderme, retina e cérebro (Vasireddy *et al.* 2007). Na mosca *D. melanogaster* os VCLFA produzidos pela elongase denominada *bond* são importantes para a modulação da membrana celular, de forma a garantir a curvatura da célula durante a citocinese de espermátocitos. Há também expressão do gene *bond* em embriões - em grupos celulares relacionados com a formação dos oenócitos e da *corpora allata* - e nos ovários (Szafer-Glusman *et al.* 2008). Ainda em *D. melanogaster*, um outro gene *elovl*, batizado *noa*, é expresso no sistema nervoso durante a embriogênese, nos discos imaginários, nos ovários - mais especificamente nas células nutridoras (*nurse cells*), no corpo gorduroso, túbulos de Malpighi e ainda nas gônadas sexuais de ambos os sexos. Em machos o RNAi para este gene gera adultos estéreis (Jung *et al.* 2007).

Apesar do comprovado papel das elongases na impermeabilidade cuticular em plantas e mamíferos (vide item 1.6), em insetos até o momento não há trabalhos que comprovem diretamente sua relação com a formação de hidrocarbonos e a impermeabilização cuticular. Os dados da literatura relativos ao potencial papel das elongases neste grupo de organismos são indiretos. Qiu e colaboradores (2012) mostraram em *D. melanogaster*, através de ensaios funcionais, que o gene *CYP4G1*, que pertence à família das P450, está envolvido com a produção de hidrocarbonos a partir de aldeídos de cadeia longa que, por sua vez, são originados de VCFLA. O silenciamento de *CYP4G1* (por meio de *RNAi*) acarretou em deficiência de hidrocarbonos de cadeia muito longa em tegumentos de moscas adultas, que se mostraram mais susceptíveis à dessecação do que moscas selvagens. Dessa forma, pode-se sugerir que a formação de VCLFA, a partir das elongases, seria importante para a formação de hidrocarbonos de cadeia muito longa em insetos, como é visto em plantas. Além disso, os hidrocarbonos, apesar de serem compostos quimicamente simples, têm funções importantes em insetos estando envolvidos no mimetismo químico e síntese de feromonios essenciais para a comunicação em insetos (Howard & Blomquist 2005).

Em *T. castaneum* a expressão do gene *Tc-elovl01* na serosa já foi relatada no trabalho de Rezende (2008), através de hibridização *in situ* fluorescente. No presente trabalho buscamos estender essas avaliações sobre todos os genes *Tc-elovl* expressos na serosa. Dos 18 parálogos de *Tc-elovl* preditos no genoma, quatro (*Tc-elovl01* a *04*) são expressos com 14 horas de embriogênese (momento em que a serosa está secretando a cutícula serosa), como visto no *BeetleBase* e confirmado por RT-PCR.

As hibridizações *in situ* colorimétricas aqui realizadas confirmaram que, além de *Tc-elovl01* observado previamente (Rezende 2008), os outros 3 genes *Tc-elovl* (*02* a *04*) são expressos na serosa de *T. castaneum*. O gene *Tc-elovl03* mostra marcação na serosa e também nas células do embrião. A expressão de diferentes genes *elovl* em um mesmo tecido evidencia uma possível subfuncionalização dos vários parálogos. Sabemos que em *T. castaneum* o silenciamento de apenas *Tc-elovl01* não é capaz de afetar a impermeabilidade dos ovos (Jacobs, comunicação pessoal). Isso pode estar relacionado com a presença das outras elongases na serosa, que seriam

capazes de manter a síntese de VCFLA. Os diferentes genes *elovl* expressos no mesmo tecido poderiam atuar de forma compensatória: caso um dos genes seja silenciado, os outros parálogos poderiam ter a sua expressão aumentada. Pretendemos futuramente investigar se ocorre sinergismo na expressão dos quatro *elovl* na serosa, bem como realizar silenciamentos duplos, triplos e quádruplos via RNAi.

Acreditamos que no besouro *T. castaneum* os genes *elovl* expressos na serosa sejam relevantes para a formação de hidrocarbonos e que estas biomoléculas atuem na formação e composição da cutícula serosa, garantindo a resistência dos ovos à dessecação - que ocorre graças ao surgimento desta estrutura. A partir dos resultados oriundos desta dissertação pretendemos avançar e compreender a função dos genes *elovl* na serosa. A hipótese de trabalho é que os quatro genes *elovls* são relevantes para a formação de VCLFA e conseqüentemente para os fosfolípidios ou hidrocarbonos presentes na cutícula serosa. Estas biomoléculas hidrofóbicas seriam essenciais para a impermeabilização conferida por esta estrutura.

## 6. CONCLUSÕES

- O genoma de *T. castaneum* apresenta 18 parálogos de *elovl*.
- Apenas os genes *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04* são expressos na serosa, antes dessa sintetizar a cutícula serosa, ainda que apresentem padrão de expressão diferentes.

## 7. REFERÊNCIAS

- Altincicek, B., Knorr, E., Vilcinskas, A. (2008) Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32: 585–595.
- Arakane, Y., Specht, C.A., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S. Beeman, R.W. (2008) Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 959–962.
- Beckel, W. (1958) Investigation of permeability, diapause and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* Dyar. *Canadian Journal of Zoology*, 36: 541-554.
- Benton, M. A., Akam, M., Pavlopoulos, A. (2013). Cell and tissue dynamics during *Tribolium* embryogenesis revealed by versatile fluorescence labeling approaches. *Development*, 140: 3210-3220.
- Bérenos, C., Schmid-Hempel, P., Wegner, K.M. (2009) Evolution of host resistance and trade-offs between virulence and transmission potential in an obligately killing parasite. *Journal of Evolutionary Biology*, 22: 2049–2056.
- Berger-Twelbeck, P., Hofmeister, P., Emmling S., Dorn, A. (2003) Ovicide-induced serosa degeneration and its impact on embryonic development in *Manduca sexta* (Insecta: Lepidoptera). *Tissue Cell*, 35: 101–112.
- Brown, S.J., Parrish, J.K., Denell, R.E., Beeman, R.W. (1994) Genetic control of early embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *American Zoologist*, 34: 343-352.
- Brown, S.J., Shippy, T.D., Miller, S., Bolognesi, R., Beeman, R.W., Lorenzen, M.D., Bucher, G., Wimmer, E.A., Klingler, M. (2009) The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): a model for studies of development and pest biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4: 1-9.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J. (2007) *Invertebrados*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 968p..
- Bucher, G., Scholten, J., Klingler, M. (2002) Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology*, 12: 85–86.
- Brusca, R.C., BRUSCA, G.J. (2007) *Invertebrados*. 2a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 968p.
- Cameron, D.J., Tong, Z., Yang, Z., Kaminoh, J., Kamiyah, S., Chen, H., Zeng, J., Chen, Y., Luo, L., Zhang, K. (2007) Essential role of *Elovl4* in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *International Journal of Biology*, 3: 111-119.

- Chapman, R.F. (2013) *The insects - Structure and function*. 5<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 959 pp.
- Chaudhari, S.S., Noh, M.Y., Moussian, B., Specht, C.A., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Arakane, Y., Muthukrishnan, S. (2015) *Knickkopf* and *retroactive* proteins are required for formation of laminar serosal procuticle during embryonic development of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60: 1-6.
- Chown, S.L., Sorensen, J.G., Terblanche, J.S. (2011) Water loss in insects: An environmental change perspective. *Journal of Insect Physiology*, 57: 1070-1084.
- Cook, H.W., McMaster, C.R. (2002) Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In: Vance, D.E., Vance, J.E. (orgs.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier, pp. 181–204.
- Counce, S.J. (1961) The analysis of insect embryogenesis. *Annual Review of Entomology*, 6,295-312.
- Davis, G.K., Patel, N.H. (2002) Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annual Review of Entomology*, 47:. 669-699.
- Dawson, P.S. (1977) Life history strategy and evolutionary history of *Tribolium* flour beetles. *Evolution*, 31: 226–229. [10.2307/2407562](https://doi.org/10.2307/2407562).
- Demuth, J.P., Wade, M.J. (2007a) Population differentiation in the beetle *Tribolium castaneum*. I. Genetic architecture. *Evolution*, 61: 494–509.
- Demuth, J.P., Wade, M.J. (2007b) Population differentiation in the beetle *Tribolium castaneum* II: Haldane's rule and incipient speciation. *Evolution*, 61: 694-699.
- Dorn, A. (1976) Ultrastructure of embryonic envelopes and integument of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera): I. Chorion, amnion, serosa, integument. *Zoomorphologie*, 85: 111–131.
- Dorn, A. (1978) Ultrastructure of embryonic envelopes and integument of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera) II. Secondary dorsal organ. *Zoomorphologie*, 89: 57–72.
- Eckert, C., Aranda, M., Wolff, C., Tautz, D. (2004) Separable stripe enhancer elements for the pair-rule gene *hairy* in the beetle *Tribolium*. *EMBO Reports*, 5: 638–642.
- Falciani, F., Hausdorf, B., Schroder, R., Akam, M., Tautz, D., Denell, R., Brown, S. (1996). Class 3 Hox genes in insects and the origin of zen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (16): 8479-8484.
- Fausto, A.M., Gambellini, G., Mazzini, M., Cecchettini, A., Locci, M.T., Masetti, M., Giorgi, F. (2001). Serosa membrane plays a key role in transferring

vitellin polypeptides to the perivitelline fluid in insect embryos. *Development, Growth & Differentiation*, 43: 725-733.

- Furueux, P.J.S., Mackay, A.L. (1976) The composition, structure and formation of the chorion and the vitelline membrane of the insect eggshell. *In*: Hepburn, H.R. (ed.). *The insect integument*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, pp. 157-176.
- Gaigg, B., Toulmay, A., Schneiter, R. (2006) 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*, 281: 34135-34145.
- Goltsev, Y., Rezende, G.L., Vranizan, K., Lanzaro, G., Valle, D., Levine, M. (2009) Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Developmental Biology*, 330: 462-470.
- Good, N.E. (1936) The flour beetles of the genus *Tribolium*. *Technical Bulletin*, 498: 1186-1243.
- Gorman, M.J., Kankanala, P., Kanost, M.R. (2004) Bacterial challenge stimulates innate immune responses in extra-embryonic tissues of tobacco hornworm eggs. *Insect Molecular Biology*, 13: 19-24.
- Grimaldi, A., Caccia, S., Congiu, T., Ferrarese, R., Tettamanti, G., Rivas-Pena, M., Perletti, G., Valvassori, R., Valvassori, R., Giordana, B., Falabella, P., Pennacchio, F., de Eguileor, M. (2006) Structure and function of the extraembryonic membrane persisting around the larvae of the parasitoid *Toxoneuron nigriceps*. *Journal of Insect Physiology*, 52: 870-880.
- Grimaldi, D.A., Engel, M.S. (2005) *Evolution of the Insects*. Cambridge: University Press. Cambridge, 755 pp.
- Handel, K., Grunfelder, C.G., Roth, S., Sander, K. (2000) *Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. *Development Genes and Evolution*, 210: 167-179.
- Hadley, N.F. (1980) Surface waxes and integumentary permeability. *American Scientist*, 68: 546-553.
- Handel, K., Basal, A., Fan, X., Roth, S. (2005). *Tribolium castaneum* twist: gastrulation and mesoderm formation in a short-germ beetle. *Development Genes and Evolution*, 215: 13-31.
- Hartley, J.C. (1962) The egg of *Tetrix* (Tetrigidae, Orthoptera), with a discussion on the probable significance of the anterior horn. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 103: 253-259.
- Hinton, H.E (1981) *Biology of insect eggs*. New York: Pergamon Press, 1125p.

- Howard, R.W., Blomquist, G.J. (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, 50: 371-393.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., St John, O., Wild, R., Hammond, P.M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M.S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T.G., Bocakova, M., Bocak, L., Vogler, A.P. (2007) A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, 318: 1913–1916
- Jacobs, C.G., van der Zee, M. (2013) Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa. *Developmental & Comparative Immunology*, 41: 263-269.
- Jacobs, C.G., Rezende, G.L., Lamers, G.E., van der Zee, M. (2013) The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proceedings of Royal Society B: Biology Science*, 280: 1082.
- Jakobsson, A., Westerberg, R., Jacobsson, A. (2006) Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in lipid research*, 45: 237-249.
- Johansen, O., Butt, F. (1941) *Embryology of insects and myriapods*. New York: Copyright McGraw-Hill Education, 484p.
- Joubes, J., Raffaele, S., Bourdenx, B., Garcia, C., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Domergue, F., Lessire, R. (2008) The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Molecular Biology*, 67: 547-566.
- Jung, A., Hollmann, M., Schäfer, M.A. (2007) The fatty acid elongase NOA is necessary for viability and has a somatic role in *Drosophila* sperm development. *Journal of Cell Science* 120: 2924-2934.
- Kimelman, D., Martin, B.L. (2012) Anterior–posterior patterning in early development: three strategies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1: 253-266.
- Klingler, M. (2004) *Tribolium*. *Current Biology*, 14: 639-640.
- Klowden, M.J. (2007) *Physiological systems in insects*. New York: Academic Press, 688p.
- Kosman, D., Mizutani, C.M., Lemons, D., Cox, W.G., McGinnis, W., Bier, E. (2004) Multiplex detection of RNA expression in *Drosophila* embryos. *Science*, 305: 846.
- Lamer, A., Dorn, A. (2001) The serosa of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera): ontogeny, secretory activity, structural changes, and functional considerations. *Tissue Cell*, 33: 580-595.
- Leonard, A.E., Pereira, S.L., Sprecher, H., Huang, Y.S. (2004) Elongation of long-chain fatty acid. *Progress in Lipid Research*, 43: 36-54.



- Lincoln, D.C.R. (1961) The oxygen and water requirements of the egg of *Ocyptus olens* Müller (Staphylinidae, Coleoptera). *Journal of Insect Physiology*, 7: 265-272.
- Lorenzen, M.D., Kimzey, T., Shippy, T.D., Brown, S.J., Denell, R.E., Beeman, R.W. (2007) piggyBac-based insertional mutagenesis in *Tribolium castaneum* using donor/helper hybrids. *Insect Molecular Biology*, 16: 265–275.
- Lorini, I. (2002) 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, 378-397pp.
- Machida, R. (2006) Evidence from embryology for reconstructing the relationships of hexapod basal clades. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 64: 95-104.
- Margaritis, L.H. (1985) Structure and physiology of the eggshell. In: Kerkut, G.A., Gilber, L.I. (eds.). *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, Pergamon Press, Oxford.
- Menezes, T. (2014) Análise temporal da formação da cutícula serosa e da expressão do gene *grainyhead* na embriogênese inicial do besouro *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797). Monografia (Licenciatura em Biologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R.S., Donath, A., Mayer *et al.* (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346: 763-767.
- Monroig, O., Rotllant, J., Sánchez, E., Cerdá-Reverter, J.M., Tocher, D.R. (2009) Expression of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis genes during zebrafish *Danio rerio* early embryogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791: 1093-1101.
- Monroig, O., Webb, K., Ibarra-Castro, L., Holt, G.J., Tocher, D.R. (2011) 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*, 312: 145-153.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3<sup>a</sup> ed. New York: Worth Publishers, pp. 1100.
- Ober, K.A., Jockusch, E.L. (2006) The roles of *wingless* and *decapentaplegic* in axis and appendage development in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology*, 294: 391–405.
- Panfilio, K.A. (2008). Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Developmental Biology*, 313: 471-491.

- Panfilio, K.A., Oberhofer, G., Roth, S. (2013). High plasticity in epithelial morphogenesis during insect dorsal closure. *Biology Open* 2, 1108-1118.
- Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Le Goff, G., Young, S., Wajnberg, E., Fricaux, T., Taquet, N., Blomquist, G.J., Feyereisen, R. (2012) An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 14858-14863.
- Rafiqi, A.M., Lemke, S., Ferguson, S., Stauber, M., Schmidt-Ott, U. (2008) Evolutionary origin of the amnioserosa in cyclorrhaphan flies correlates with spatial and temporal expression changes of zen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 234-239.
- Rey, L. (2001) *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 349pp.
- Rezende, G.L. (2008) Investigações sobre a aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Rio de Janeiro - RJ. Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), RJ, 2008.
- Rezende, G.L., Martins, A.J., Gentile, C., Farnesi, L.C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A.A., Valle, D. (2008) Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Developmental Biology*, 8: 82.
- Richards, S., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Brown, S.J., Denell, R., et al. (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452: 949–955.
- Ridley, M. (2004) *Evolution*. 3ª ed. Turin: Wiley-Blackwell, 784p.
- Ross, H.H., Ross, C.A., Ross, J.R.P. (1982) *A textbook of entomology*. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 666 p..
- Ruppert, E., Barnes, R.D. (1996) *Zoologia dos Invertebrados*. 6ª ed. São Paulo: Ed. Roca, 1029p.
- Sabri, A., Hance, T., Leroy, P.D., Frere, I., Haubruge, E., Destain, J., Compere, P., Thonart, P. (2011) Placenta-like structure of the aphid endoparasitic wasp *Aphidius ervi*: a strategy of optimal resources acquisition. *PLoS One*, 6: e18847.
- Sarrazin, A.F., Peel, A.D., Averof, M. (2012). A segmentation clock with two-segment periodicity in insects. *Science*, 336: 338-341.
- Savard, J., Tautz, D., Lercher, M.J. (2006) A segmentation gene in *Tribolium* produces a polycistronic mRNA that codes for multiple conserved peptides. *Cell*, 126: 559-569.
- Schroder, R., Beermann, A., Wittkopp, N., Lutz, R. (2008) From development to biodiversity - *Tribolium castaneum*, an insect model organism for short

- germband development. *Development Genes and Evolution*, 218: 119-126.
- Scott, M.P., Weiner, A.J. (1984) Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 4115-4119
- Slifer, E.H. (1937) The origin and fatge of the membrane surrounding the grasshopper egg; together with some experiments on the source of the hatching enzyme. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 79: 493-506.
- Sokoloff, A. (1964) Sex and crossing over in *Tribolium castaneum*. *Genetics*, 50: 491-496.
- Szafer-Glusman, E., Giansanti, M.G., Nishihama, R., Bolival, B., Pringle, J., Gatti, M., Fuller, M.T. (2008) A role for very-long-chain fatty acids in furrow ingression during cytokinesis in *Drosophila* spermatocytes. *Current Biology*, 18: 1426-1431.
- Tomoyasu, Y., Wheeler, S.R., Denell, R.E. (2005) Ultrabithorax is required for membranous wing identity in the beetle *Tribolium castaneum*. *Nature*, 433: 643–647.
- Toutges, M.J., Hartzler, K., Lord, J., Oppert, B. (2010) Evaluation of reference genes for quantitative polymerase chain reaction across life cycle stages and tissue types of *Tribolium castaneum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 8948-8951.
- van der Zee, M., Berns, N., Roth, S. (2005). Distinct functions of the *Tribolium* zerknüllt genes in serosa specification and dorsal closure. *Current Biology*, 15: 624-636.
- van Emden, H.F. (2013) *Handbook of agricultural entomology*. Wiley-Blackwell, pp. 334
- Vargas, H.C.M., Farnesi, L.C., Martins, A.J., Valle, D., Rezende, G.L. (2014) Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Insect Physiology*, 62: 54-60.
- Vasireddy, V., Uchida, Y., Salem Jr, N., Kim, S.Y., Mandal, M.N., Reddy, G.B., Bodepudi, R., Alderson, N.L., Brown, J.C., Hama, H., Dlugosz, A., Elias, P.M., Holleran, W.M., Ayyagari, R. (2007) Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty chain ( $\geq C28$ ) and the unique omega-O-acylcwramides in skin leading to neonatal death. *Human Molecular Genetics*, 16: 471-482.
- Vogg, G., Fischer, S., Leide, J., Emmanuel, E., Reinhard, J., Levy, A.A., Riederer, M. (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant

deficient in a verylong-chain fatty acid -ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1401-1410.

Watt, J.C. (1974) A revised subfamily classification of Tenebrionidae (Coleoptera). *New Zealand Journal of Zoology*, 1: 381-452.

Woods, H.A., Bonnecaze, R.T., Zrubek, B. (2005) Oxygen and water flux across eggshells of *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Biology*, 208: 1297–1308.

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

Zou, Z., Evans, J.D., Lu, Z., Zhao, P., Williams, M., *et al.* (2007) Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome Biology*, 8: 177.