

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Jaqueline Rodrigues da Silva

COMPARAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO
GORDUROSO DE *Zophobas morio*: FUNÇÃO DE AMP-CoA LIGASES NOS
TÚBULOS E RELAÇÃO COM LANTERNAS DE *Arachnocampa luminosa*

São Carlos

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Jaqueline Rodrigues da Silva

COMPARAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO
GORDUROSO DE *Zophobas morio*: FUNÇÃO DE AMP-CoA LIGASES NOS
TÚBULOS E RELAÇÃO COM LANTERNAS DE *Arachnocampa luminosa*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Vadim R. Viviani

São Carlos

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Jaqueline Rodrigues da Silva, realizada em 27/10/2017:

Prof. Dr. Vadim Viviani
UFSCar

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin
UFSCar

Profa. Dra. Heloisa Soeiro Solistré da Araujo
UFSCar

Prof. Dr. Anderson Garbuglio de Oliveira
UNIFESP

Profa. Dra. Marcia Regina Brochetto Braga
UNESP

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio dos processos 2012/23578-3 e 2013/09594-0, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico esse trabalho à todos que me apoiaram, principalmente minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo e melhor amigo, Nilson, pela preocupação, amor, conselhos, suporte estatístico e pelo constante incentivo.

Aos meus pais e familiares pelo apoio e por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu orientador, Vadim Viviani, pela oportunidade, orientação durante a execução deste trabalho e pela enorme contribuição para minha formação profissional.

A todos orientados do Prof. Vadim, principalmente Rogilene, Danilo, Gabriele Gabriela, pela companhia e por todo o auxílio durante a pesquisa.

A todos os professores, colegas e secretárias da PPGGev.

A todos da UFSCar-Sorocaba, administração, técnicos, secretárias, Roseli (secretária do PPGBMA), professores, equipe da limpeza e manutenção.

A FAPESP e CNPq pelos recursos financeiros.

RESUMO

Os túbulos de Malpighi em insetos estão relacionados com a osmorregulação, realizando o transporte de íons e fluídos durante a formação da urina primária, enquanto que o corpo gorduroso é usualmente associado ao metabolismo intermediário. Os túbulos também excretam solutos orgânicos e xenobióticos, estando envolvidos com variadas outras funções não excretoras, incluindo a bioluminescência em Diptera. Portanto existe interesse em se compreender melhor a fisiologia e diferenciação molecular deste tecido em insetos. Com a exceção de uma análise preliminar dos transcritos dos túbulos de larvas de *Zophobas morio* e da clonagem de uma enzima tipo luciferase que emite fraca bioluminescência na presença de D-luciferina de vagalume não há estudos detalhados do transcriptoma deste tecido em Coleoptera. Para melhor compreender a fisiologia molecular dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso e a função de AMP-CoA ligases em Coleoptera, realizamos uma análise comparativa dos transcriptomas destes órgãos de *Z. morio*. Os túbulos, como esperado, exibiram transportadores orgânicos e inorgânicos, V-ATPases, canais, bombas e enzimas relacionadas com detoxificação. O corpo gorduroso exibiu proteínas que são sintetizadas neste tecido e secretadas para a hemolinfa, tais como hexamerinas e apolipoporinas; enzimas relacionadas com o metabolismo de proteínas; lipídeos e carboidratos. Embora estes tecidos participem de funções fisiológicas distintas em insetos, eles também estão envolvidos em vias metabólicas comuns, como imunidade, biossíntese de pigmentos oculares, degradação e excreção de compostos nitrogenados, e detoxificação. Deste modo, nossos resultados corroboram com a versatilidade fisiológica dos túbulos e corpo gorduroso em uma larva de Coleoptera. Além disso, nossa análise também indicou a presença de isoformas de enzimas tipo cumarato ligases, que possuem similaridade com ligases, as quais podem estar envolvidas na degradação de compostos derivados de ácidos cumáricos ou na biossíntese de pigmentos.

Palavras chaves: detoxificação, excreção, enzimas tipo-luciferase

ABSTRACT

The Malpighian tubules in insects play an essential role in osmoregulation, performing transport of ions and fluids during the formation of primary urine, whereas fat body is usually associated with the intermediary metabolism. The tubules also are involved in excretion of organic solutes and xenobiotics, and in unusual functions such as bioluminescence in Diptera. However, with the exception of a preliminary transcriptional survey of the *Zophobas morio* larval tubules, there are no detailed transcriptional analysis of this organ in Coleoptera. A luciferase-like enzyme that displays weak luminescence activity in the presence of firefly D-luciferin was cloned from the tubules of *Z. morio* larvae. Therefore, to better understand the molecular physiology of tubules and fat body in Coleoptera and analyse the AMP-CoA ligases enzymes, we performed a comparative transcriptional analysis of these tissues from *Z. morio*. As expected, the tubules displayed organic and inorganic transporters, xenobiotic metabolism enzymes, V-ATPases, channels, and pumps. Fat body showed proteins that are synthesized in this tissue and secreted to the hemolymph, lipidic and carbohydrates metabolism enzymes. Although these tissues perform distinct physiological functions in insects, they are also involved in common pathways, such as nitrogen metabolism to degradation/excretion, eye pigments biosynthesis, immunity, and detoxification. Ours results corroborate to the physiological versatility of tubules and fat body in a Coleopteran larvae. Furthermore our analysis also indicates the presence of coumarate like-ligases isoforms that could be related to degradation of coumaric acids derivatives or biosynthesis of eye pigments.

Key words: detoxication, excretion, luciferase like-enzymes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Tipos celulares que constituem a parede dos túbulos de Malpighi. A. 2
Túbulos de *Drosophila*. B. Transportador iônico NHE8 (vermelho) nas células
principais de *Aedes*. Adaptado de BEYENBACH et al., 2010.....
- Figura 2:** Mecanismo geral de excreção em insetos. O fluído é secretado da 3
hemolinfa para os túbulos de Malpighi e transportado para o intestino posterior, no
reto ocorre a reabsorção de compostos úteis e o fluido remanescente é excretado pelo
ânus. Adaptado de KLOWDEN, 2007.....
- Figura 3:** Bioluminescência emitida por larvas de *Arachnocampa luminosa*, onde as 6
lanternas são derivadas dos túbulos de Malpighi. Imagem: Vadim Viviani.....
- Figura 4:** Larva de *Zophobas morio* com aproximadamente 6,0 cm. Fonte: Viviani et 9
al., 2009.....
- Figura 5:** CCD imagem da larva de *Zophobas morio*. A. Imagem real da larva. B.
Imagem da quimioluminescência induzida da larva após injeção intracuticular de 100
µl de D-luciferina de vagalume 10 mM em tampão citrato 0,1 M pH 5,0 após 5 min
de exposição. C. Túbulos de Malpighi isolados de larvas após injeção de D-luciferina.
D. Imagem da quimioluminescência dos túbulos isolados após injeção de D-luciferina
obtida após 30 min de exposição em alta sensibilidade. Fonte: VIVIANI et al.,
2009..... 9
- Figura 6:** Esquema das etapas da reação de emissão de luz pelo processo de
bioluminescência em vagalumes. Adaptado de: BRANCHINI et al., 2003..... 10
- Figura 7:** Fotografias do teto de uma caverna, mostrando (A) larva de
Arachnocampa luminosa em suas teias viscosas e (B) um pequeno inseto voador
preso nessas teias. Adaptado de MEYER-ROCHOW, 2007..... 13
- Figura 8:** Anotação do GO dos transcritos dos túbulos de Malpighi de larvas de *Z.*
morio..... 27
- Figura 9:** Anotação do GO dos transcritos do corpo gorduroso de larvas de *Z. morio*. 28

- Figura 10:** Classificação do GO dos transcritos dos túbulos de Malpighi e do corpo gorduroso de larvas de *Z. morio* pelo WEGO..... 29
- Figura 11:** Sumário de alguns produtos gênicos envolvidos nas funções das células tubulares (células principais e estreladas) de larvas de *Z. morio* baseado no modelo proposto para os túbulos de *D. melanogaster*. Adaptado de WANG et al., 2004..... 31
- Figura 12:** Anotação do GO dos transcritos das lanternas do díptero bioluminescente *A. luminosa*..... 35
- Figura 13:** Alinhamento das estruturas primárias das hexamerinas de lanternas de *A. luminosa* (Hex 292 e Hex 514), túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *Z. morio* (Hex ZOP), *larval serum protein 2* de *C. quinquefasciatus* (LSP 2Cqui) XP001843494.1 e hexamerina de *Aedes aegypti* (HexAaeg) XP001661466.1..... 36
- Figura 14:** Árvore filogenética das hexamerinas baseada em análise Bayesiana..... 37
- Figura 15:** Gel de agarose 1% da amplificação de um transcrito similar à AMP-CoA ligase dos túbulos de Malpighi de larvas de *Z. morio*. A. Ausência de amplificação na 1ª reação. B. Gene amplificado na 2ª reação de amplificação..... 40
- Figura 16:** Árvore filogenética das AMP-Coas ligases baseada em análise Bayesiana. 41
- Figura 17:** Comparação dos motivos conservados nas enzimas AMP-CoA ligases: ligase dos túbulos de Malpighi (MT Ligase 17151) e corpo gorduroso (FB Ligase 15990) de *Z. morio*, 4-cumarate-CoA ligase 2 de *Arabidopsis thaliana* OAP07084.1 (coumarate), enzima tipo luciferase previamente clonada desta espécie (Proto Zop), luciferase *A. luminosa* (Luc Arach), luciferase de *Photinus pyralis* AB644228.1 (Luc Ppy) e luciferase de *Phrixothrix hirtus* FJ54529.1 (Luc P. hirtus)..... 43
- Figura 18:** Células principais e estreladas dos túbulos de Malpighi de *Tribolium castaneum*. A e B: Porção dos túbulos de um indivíduo adulto marcado para DNA (azul), fator de transcrição *Tiptop* (vermelho que sobreposto parece rosa escuro) e actina (verde). Em B, a célula estrelada está circulada em branco e as célula principal circulada em amarelo. Fonte: KING e DENHOLM, 2014..... 46

- Figura 19:** Interconversões de glicogênio, glicose e trealose. O glicogênio é a forma de armazenamento dos carboidratos e é convertido em glicose e trealose quando energia é requerida. Adaptado de: KLOWDEN, 2007..... 53
- Figura 20:** Diagrama representando os transcritos similares à citocromos P450 no corpo gorduroso e túbulos de Malpighi de larvas de *Z. morio*..... 59
- Figura 21:** Via para a síntese de ácido úrico a partir de ácidos nucleicos e proteínas. O intermediário inosina monofosfato requer ATP para sua formação. Os passos da síntese de amônia e dióxido de carbono não ocorrem nos insetos. Adaptado de: KLOWDEN, 2007..... 61
- Figura 22:** A: Via biossintética de pigmentos omócromos em insetos. B: Estruturas químicas dos compostos envolvidos na via biossintética de pigmentos omócromos. Adaptado de: SUMMERS et al., 1982..... 62
- Figura 23:** Estrutura química de (A) pteridina e (B) isoxantopteridina. Fonte: SUMMERS et al., 1982..... 63
- Figura 24:** Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos. Adaptado de: ADISAKWATTANA et al., 2009..... 68
- Figura 25:** Modelo 3D do SBP da isoforma At4CL2. O modelo mostra os 12 resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação ao ácido caféico. A linha pontilhada representa uma ligação de hidrogênio. Fonte: SCHNEIDER et al., 2003..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> usados na amplificação de 4-cumarato-ligases dos túbulos de Malpighi (MT 1 e MT 2) e corpo gorduroso (CG) de <i>Z. morio</i>	22
Tabela 2: Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> usados na amplificação e sequenciamento das enzimas tipo luciferase e hexamerinas das lanternas de <i>A. luminosa</i>	25
Tabela 3: <i>Blast hits</i> e anotação das sequências de cada tecido analisado de <i>Z. morio</i> .	26
Tabela 4: Número de transcritos dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de larvas de <i>Z. morio</i> que foram classificados de acordo com as categorias do GO.....	27
Tabela 5: Vias metabólicas nas quais os transcritos dos túbulos de Malpighi e do corpo gorduroso de larvas de <i>Z. morio</i> estão relacionados.....	30
Tabela 6: Transcritos mais abundantes nos túbulos de Malpighi de larvas de <i>Z. morio</i>	32
Tabela 7: Transcritos mais abundantes no corpo gorduroso de larvas de <i>Z. morio</i>	33
Tabela 8: Identidade dos transcritos similares à AMP-CoA ligases dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de <i>Z. morio</i> com a enzima tipo luciferase previamente clonada a partir dos túbulos desta espécie, e a abundância (FPKM) destes transcritos nos tecidos analisados.....	39
Tabela 9: Transcritos do corpo gorduroso de larvas de <i>Z. morio</i> que são relacionados com a imunidade.....	56

LISTA DE SIGLAS**Aminoácidos:**

A: Alanina

C: Cisteína

D: Aspartato

E: Glutamato

F: Fenilalanina

G: Glicina

H: Histidina

I: Isoleucina

K: Lisina

L: Leucina

M: Metionina

N: Asparagina

P: Prolina

Q: Glutamina

R: Arginina

S: Serina

T: Treonina

V: Valina

W: Triptofano

Y: Tirosina

CCD: Dispositivo de carga acoplada (*Charge-Coupled Device*)

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

CoA: Coenzima A

DEPC: Dietil pirocarbonato

dNTP: Desoxirribonucleotídeo fosfatado

DTT: Ditioneitol

EC: Comissão de enzimas

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético

FPKM: *Fragments per Kilobase Million*

GO: *Gene Ontology*

IPTG: Isopropil- β -D-1-galactosídeo

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LB: Luria Bertani (Meio de Cultura Bacteriano)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RPM: rotações por minuto

SBP: *Substrate binding pocket*

WEGO: *Web Gene Ontology Annotation Plot*

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. TÚBULOS DE MALPIGHI.....	1
1.1.1. Funções não excretoras dos túbulos de Malpighi.....	5
1.2. CORPO GORDUROSO.....	6
1.3. <i>Zophobas morio</i>	8
1.3.1. Enzima tipo luciferase dos túbulos de Malpighi de <i>Z. morio</i>.....	9
1.4. BIOLUMINESCÊNCIA.....	10
1.4.1. Bioluminescência na Família Keroplatidae (Diptera).....	11
1.4.2. Gênero <i>Arachnocampa</i> (Keroplatidae: Diptera).....	12
1.4.3. Lanternas de <i>Arachnocampa</i> spp. se originaram da especialização dos túbulos de Malpighi.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
4.2. ISOLAMENTO DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO DE LARVAS DE <i>Z. morio</i>	17
4.3. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO.....	17
4.4. TRANSCRIPTOMA POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO DE <i>Z. morio</i>	18
4.4.1. Construção de biblioteca de cDNA <i>paired-end</i> Illumina e sequenciamento... 19	19
4.4.2. Montagem <i>de novo</i> dos transcriptomas..... 19	19
4.4.3. Anotação dos transcritos, análises computacionais das sequências e cálculo da abundância..... 20	20
4.5. OBTENÇÃO DO cDNA DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO.....	20
4.6.1. Amplificação de AMP-CoA ligases dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso..... 21	21
4.7. ANÁLISE TRANSCRICIONAL DA BIBLIOTECA DE cDNA DAS LANTERNAS DE LARVAS DE <i>A. luminosa</i> (DIPTERA: KEROPLATIDAE).....	22

4.7.1. Biblioteca de cDNA.....	22
4.7.2. Excisão da biblioteca de cDNA na forma plasmidial.....	22
4.7.3. Extração de DNA plasmidial das colônias recombinantes.....	23
4.7.4. Sequenciamento dos clones aleatoriamente selecionados.....	24
4.7.5. Análise bioinformática.....	24
4.7.6. Sequenciamento completo e análise bioinformática das hexamerinas e enzimas tipo luciferase da biblioteca de cDNA das lanternas de <i>A. luminosa</i>	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. MONTAGEM <i>DE NOVO</i> DOS TRANSCRIPTOMAS DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO E ANOTAÇÃO FUNCIONAL.....	26
5.2. TRANSCRITOS MAIS ABUNDANTES NOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO.....	31
5.3. ANÁLISE GÊNICA DA BIBLIOTECA DE cDNA DAS LANTERNAS DE LARVAS DE <i>A. luminosa</i> (DIPTERA: KEROPLATIDAE).....	34
5.3.1. Hexamerinas em lanternas de <i>A. luminosa</i> e nos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de <i>Z. morio</i>.....	34
5.4. Ocorrência de AMP-CoA ligases em túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de <i>Z. morio</i> e lanternas de <i>A. luminosa</i>	38
5.4.1. Túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de <i>Z. morio</i>.....	38
5.4.2. Lanternas de <i>A. luminosa</i>.....	40
5.4.3. Multialinhamento de CoA-ligases e análise de módulos funcionais.....	41
6. DISCUSSÃO.....	44
6.1. TÚBULOS DE MALPIGHI.....	44
6.1.1. Junções celulares dos túbulos de Malpighi.....	45
6.1.2. Maquinaria de transporte de íons e água para formação de urina.....	46
6.1.3. Transporte de solutos orgânicos e inorgânicos.....	48
6.1.4. Canais de cálcio e transportadores.....	49
6.1.5. Captação de metais.....	49
6.2. CORPO GORDUROSO.....	50
6.2.1. Junções celulares do corpo gorduroso.....	51
6.2.2. Transportadores de membrana do corpo gorduroso.....	51
6.2.3. Armazenamento e utilização de nutrientes.....	52
6.2.3.1. Metabolismo de carboidratos.....	52

6.2.3.2. Metabolismo de lipídeos.....	54
6.3. COMPARAÇÃO DOS TÚBULOS DE MALPIGHI COM CORPO GORDUROSO.....	55
6.3.1. Imunidade.....	55
6.3.2. Órgãos endócrinos.....	57
6.3.3. Detoxificação.....	57
6.3.3.1. Citocromos P450.....	58
6.3.3.2. Gutationa S-transferases.....	59
6.3.3.3. Álcool desidrogenase.....	60
6.3.4. Metabolismo de nitrogênio.....	61
6.3.5. Biossíntese de pigmentos no corpo gorduroso e túbulos de Malpighi.....	62
6.4. FUNÇÃO DAS HEXAMERINAS NOS TÚBULOS DE MALPIGHI.....	64
6.5. FUNÇÃO DAS AMP-CoA LIGASES NOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO	66
6.5.1. Inferência dos substratos das AMP-CoA ligases de <i>Z. morio</i>.....	68
6.5.2. Comparação das AMP-CoA ligases dos túbulos com a enzima tipo luciferase.....	70
6.6. RELAÇÃO MOLECULAR ENTRE OS TÚBULOS DE MALPIGHI E A ORIGEM DA BIOLUMINESCÊNCIA EM <i>Arachnocampa</i> spp.....	71
6.6.1. Função das hexamerinas nas lanternas de <i>A. luminosa</i>.....	74
6.6.2. Função das enzimas tipo luciferase nas lanternas de <i>A. luminosa</i>.....	74
6.6.3. Relação entre CoA ligases, detoxificação de xenobióticos carboxílicos e origem da bioluminescência nos túbulos de Malpighi.....	75
7. CONCLUSÕES.....	77
8.PERSPECTIVAS.....	78
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
10. ANEXO I.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. TÚBULOS DE MALPIGHI

Os insetos ocupam uma grande variedade de habitats, incluindo ambientes com situações extremas, como muito secos e com temperaturas elevadas. Esta capacidade deve-se a algumas adaptações presentes neste grupo de animais, tais como a presença de exoesqueleto impermeável e um sistema excretor considerado sofisticado. O sistema excretor tem como função manter o equilíbrio no interior do organismo através da eliminação de compostos derivados de vias metabólicas e também substâncias tóxicas (KLOWDEN, 2007).

Em conjunto com o reto, os túbulos de Malpighi constituem o sistema excretor de insetos, representando um papel chave na excreção e osmorregulação (WIGGLESWORTH, 1972; CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007). O nome deste tecido é originário do fisiologista e anatomista Marcello Malpighi (1628-1694), que em 1669 fez referência a esta estrutura em um trabalho sobre a organização interna do bicho da seda (*Bombyx morio*), mas sua função excretora não foi determinada até 1815 (KLOWDEN, 2007). Wigglesworth é considerado o fundador da fisiologia experimental de insetos, sendo que os primeiros ensaios funcionais dos túbulos foram originalmente realizados por ele na década de 1930 e depois por seus estudantes, Ramsay e Maddrell (DOW e DAVIES, 2001).

Os túbulos estão presentes na maioria dos artrópodes terrestres e surgiram independentemente em diversos táxons com função de conservação de água durante a excreção. Alguns aracnídeos possuem túbulos de Malpighi de origem endodérmica que surgem no trato digestivo médio, já os túbulos dos traqueados (hexapodas e miriápodes) são de origem ectodérmica e surgem do trato digestivo posterior. Os túbulos estão ausentes ou são vestigiais nos eutognatos (Colembola e outros) e presentes na maior parte dos insetos, como Coleoptera, Diptera e outros (RUPPERT, 2005).

A dieta, estágio de desenvolvimento e nicho ecológico são fatores que determinam o tipo de composto excretado pelo organismo. O excesso de nitrogênio proveniente da alimentação deve ser rapidamente eliminado, pois em sistemas biológicos este composto forma rapidamente amônia. Altos níveis de amônia no organismo podem

interferir na transmissão nervosa, substituindo o potássio, e também alterar o metabolismo de carboidratos e lipídios (KLOWDEN, 2007). Os túbulos excretam nitrogênio na forma de ácido úrico ou guaninas, sendo estes compostos insolúveis em água e menos tóxicos que a amônia (RUPPERT, 2005). Nem todos os insetos excretam ácido úrico e nem todos excretam apenas um composto. A alantoína, por exemplo, é excretada pelo hemíptero *Dysdercus* e algumas larvas de díptera excretam ácido alantóico (KLOWDEN, 2007).

O número de túbulos pode variar de dois a 250 dependendo do táxon, como por exemplo, *Drosophila* possui quatro e *Aedes* possui cinco (RUPPERT, 2005; BEYENBACH et al., 2010). Basicamente são tubos longos formados por uma camada de células que se dispõe ao redor de um lúmen que termina em um fundo cego. Dois tipos celulares são encontrados nos túbulos: as células principais de origem ectodérmica e as estreladas de origem mesodérmica, cada um desses tipos celulares possui uma função específica no tecido (Fig. 1) (BEYENBACH et al., 2010).

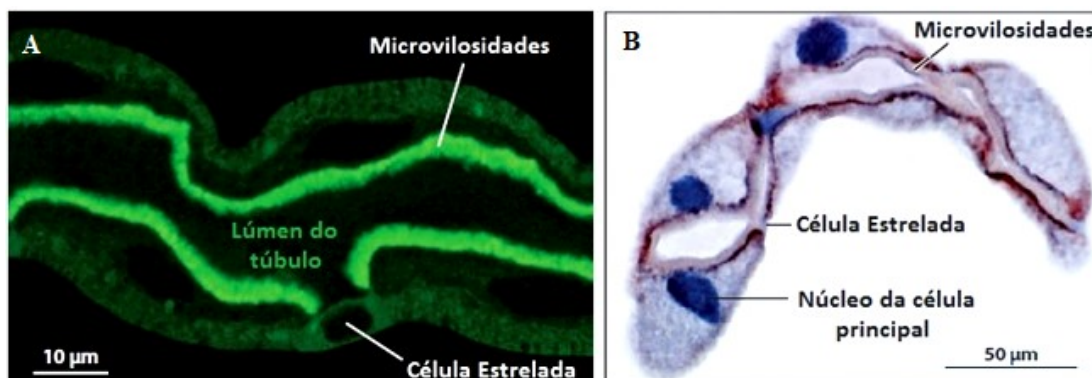


Figura 1: Tipos celulares que constituem a parede dos túbulos de Malpighi. A. Túbulos de *Drosophila*. B. Transportador iônico NHE8 (vermelho) nas células principais de *Aedes*. Adaptado de: BEYENBACH et al., 2010.

As células principais possuem grande quantidade de mitocôndrias associadas as vilosidades que estão localizadas na região apical da célula e possuem muitas invaginações na região basal que está em contato com a hemolinfa. Elas são as responsáveis pelo transporte de sódio, potássio, íons de hidrogênio e outros compostos, enquanto que as células estreladas atuam no controle do fluxo de íons de cloro (CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007). A especificação funcional das células tubulares

depende de dois fatores de transcrição: Kruppel e *homeodomain protein Cut* (BEYENBACH et al., 2010).

Os túbulos produzem a urina primária por meio do transporte de íons e fluídos e o reto modifica a urina antes de sua excreção (WIGGLESWORTH, 1972; CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007). Para o processo de formação de urina nos túbulos de Malpighi a força que dirige a excreção é o movimento de íons através do epitélio, principalmente o íon potássio, mas em insetos que se alimentam de sangue de vertebrados predomina o íon sódio (CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007). Em insetos terrestres, a produção da urina primária depende do transporte ativo de potássio ou sódio para o lúmen dos túbulos seguido pelo transporte passivo de ânions, principalmente íons cloreto (CHAPMAN, 1998). A formação da urina primária ocorre da seguinte maneira: compostos são absorvidos da hemolinfa por transporte ativo ou passivo pelos túbulos levando a formação da urina primária, em seguida as substâncias úteis, como a glicose e água, presentes neste fluido são reabsorvidas no reto e os compostos restantes são excretados (Fig. 2) (KLOWDEN, 2007). Em *Carausius*, por exemplo, em torno de 95% de sódio e 80% de potássio da urina primária podem ser reabsorvidos (CHAPMAN, 1998).

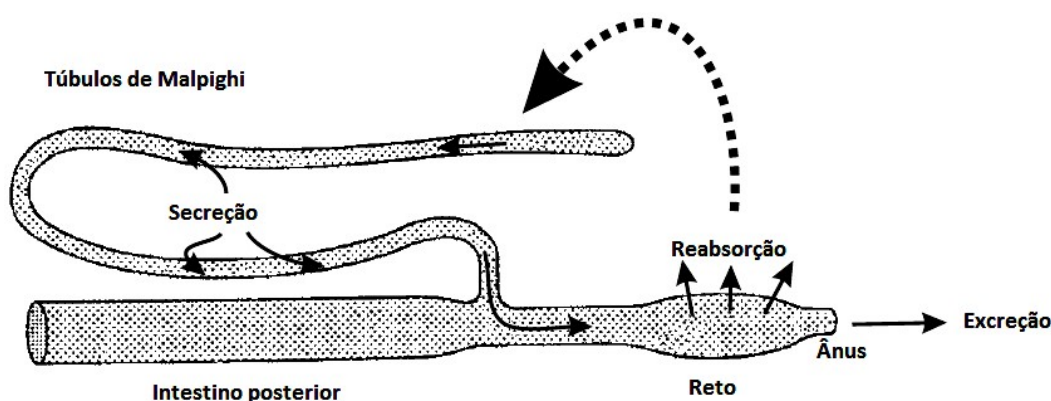


Figura 2: Mecanismo geral de excreção em insetos. O fluido é secretado da hemolinfa para os túbulos de Malpighi e transportado para o intestino posterior, no reto ocorre a reabsorção de compostos úteis e o fluido remanescente é excretado pelo ânus. Adaptado de: KLOWDEN, 2007.

Os túbulos utilizam a H^+ ATPase tipo-V (bomba de próton) para o fornecimento de energia na secreção de eletrólitos e solutos orgânicos através do bombeamento de íons de hidrogênio para o lúmen dos túbulos (CHAPMAN, 1998; BEYENBACH et al., 2010). Esta ATPase está localizada na membrana plasmática apical e é ativada pelas

mitocôndrias associadas às microvilosidades das células tubulares. Os íons de hidrogênio bombeados são trocados pelos íons potássio ou sódio e os íons de cloreto seguem o gradiente eletroquímico (CHAPMAN, 1998). Em *Aedes*, o transporte de H^+ do citoplasma para o lúmen gera uma tensão na membrana apical de 110 mV (BEYENBACH et al., 2010).

Na maioria dos insetos terrestres a taxa de formação de urina varia, em insetos que se alimentam de alimentos úmidos a secreção de fluido parece ser contínua, em hematófagos, por exemplo, ocorre a produção de grande quantidade de urina após a alimentação (CHAPMAN, 1998). A produção de urina e sua subsequente reabsorção antes da excreção são reguladas independentemente por duas classes de hormônios diuréticos, o fator de liberação de corticotropina e cininas de insetos que estimulam a produção de urina primária. Os hormônios antidiuréticos regulam a reabsorção de alguns compostos no intestino posterior e são transportados através da hemolinfa (CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007). A *Drosophila* possui dois hormônios que estão envolvidos na ativação da H^+ -ATPase que atuam na secreção de íons de sódio e potássio para o lúmen dos túbulos e a leuconina que está envolvida no aumento da permeabilidade das células estreladas para o cloreto (CHAPMAN, 1998).

Apesar de sua intrigante simplicidade e de apresentar um mecanismo bem diferente, os túbulos possuem bombas, carregadores e canais que transportam os compostos e que são similares aos rins de vertebrados, desempenhando uma função análoga a estes (MADRELL e O'DONNELL, 1992; BEYENBACH et al., 2010). Assim, eles também são reconhecidos como um modelo para estudos de doenças genéticas humanas (CHIEN et al., 2002; WANG et al., 2004). Xantínúria tipo I é uma doença causada pela mutação da xantina oxidase em que o metabolismo de purinas por meio da xantina, ácido úrico e uréia é bloqueado e cálculos são acumulados no rim. Em *Drosophila*, a mutação *rosy* apresenta altos níveis de hipoxantina e xantina, baixos níveis de uréia e alantoína, e produz cálculos similares à doença humana que podem bloquear os túbulos fazendo-os inchar. A mutação *rosy* é massivamente enriquecida nos túbulos quando comparada aos outros tecidos (MITCHELL e GLASSMAN, 1959; DOW, 2009). Durante o crescimento e desenvolvimento de larvas de bicho da seda ocorre o acúmulo de grande quantidade de cristais de oxalato de cálcio em seus túbulos de Malpighi. Neste caso, os túbulos das larvas de *B. mori* fornecem um bom modelo de estudo para a cristalização de oxalato de cálcio em rins (ZHONG et al., 2013).

Além de sua função clássica participando da osmorregulação, os túbulos de Malpighi também apresentam importante papel na excreção ativa de uma ampla variedade de compostos tóxicos como nicotina (GAERTNER et al., 1998), ouabaína (TORRIE et al., 2004), salicilato (RUIZ-SANCHEZ et al., 2007), glicosídeos cardíacos (RAFAELI-BERNSTEIN e MORDUE, 1978), morfina e atropina, sendo este papel essencial para os insetos que se alimentam de plantas contendo alcaloides e também importante para a exploração de uma ampla variedade de alimentos (MADDRELL e GARDINER, 1976).

Estudos mostraram que os túbulos de Malpighi de *Drosophila* são resistentes a ouabaína, que é um forte inibidor de ATPase Na^+/K^+ , esta resistência se deve a presença de proteínas transportadoras que possuem um amplo espectro de substratos (TORRIE et al., 2004). Larvas de *Drosophila* expostas a dietas com altas concentrações de metotrexato (ânion orgânico) demonstraram que a exposição a este composto tóxico leva a um aumento na taxa de secreção de fluidos pelos túbulos e também um aumento na expressão gênica de vários transportadores de ânions orgânicos e proteínas de choque térmico (CHACHINE e O'DONNELL, 2010). Apesar da fisiologia dos túbulos ser bem conhecida, sua bioquímica ainda é pouco compreendida.

1.1.1. Funções não excretoras dos túbulos de Malpighi

Os túbulos também possuem papel significante na imunidade por meio da secreção de peptídios antimicrobianos (NAPPI et al., 2000). Eles secretam as seguintes famílias de peptídeos: *Metchnikowin* (peptídeo antifúngico), Defensina (peptídeo antibacteriano de Gram positivas) e Cecropina (peptídeo antibacteriano de Gram negativas) (KLOWDEN, 2007).

Em algumas larvas de Neuroptera e Diptera, os túbulos são modificados para a produção de seda (WIGGLESWORTH, 1972). Os túbulos das larvas de formigas leão (Neuroptera) produzem seda que é armazenada no saco retal e em besouros crisomelídeos, os túbulos produzem uma substância viscosa que é utilizada para cobrir os ovos (CHAPMAN, 1998).

Algumas espécies armazenam cálcio nos túbulos para utilizá-lo em diversas funções, em *Carausius*, por exemplo, o cálcio é transportado para a hemolinfa e

depositado no córion dos ovos e em *Musca autumnalis* contribui para o endurecimento da cutícula da pupa (KRUEGER et al, 1988; CHAPMAN, 1998).

Em larvas de dípteros bioluminescentes de *Arachnocampa* spp os órgãos fotogênicos derivam de modificação da porção terminal dos túbulos de Malpighi (Fig. 3), a bioluminescência nestas espécies tem como função a atração de presas que ficam aderidas nas redes mucosas secretadas pelas larvas (GATENBY, 1960; VIVIANI et al., 2002).



Figura 3: Bioluminescência emitida por larvas de *Arachnocampa luminosa*, onde as lanternas são derivadas dos túbulos de Malpighi. Imagem: Vadim Viviani.

A região proximal dos túbulos de larvas de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) é alargada e as células não possuem microvilosidades, estas células produzem uma substância que quando em contato com o ar forma uma saliva que permanece no lugar onde a larva vive (CHAPMAN, 1998).

1.2. CORPO GORDUROSO

O corpo gorduroso é o principal tecido do metabolismo intermediário em insetos e é o depósito central de nutrientes e reservas energéticas. Sua importância funcional está relacionada à sua função no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas; e no processo de detoxificação de compostos tóxicos (CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007). Durante o crescimento e reprodução, o corpo gorduroso fornece energia para as atividades metabólicas de outros tecidos por meio do metabolismo de lipídios e glicogênio. O armazenamento de ácidos graxos e glicose é essencial para outras funções além de fornecer energia para o organismo. A glicose atua na síntese de quitina e os

ácidos graxos são precursores de eicosanóides e feromônios, e também são necessários para a síntese de fosfolipídios e ceras (ARRESE e SOULAGES, 2010).

Insetos compartilham com mamíferos e outros organismos vários aspectos dos mecanismos de deposição e mobilização de triglicerídeos. Tal fato valida o uso de insetos como modelo para a investigação de questões básicas relacionadas à processos de armazenamento e mobilização de lipídeos. A descoberta de novos reguladores do metabolismo de lipídeos é facilitada em insetos modelos, como a mosca da fruta, devido ao seu tamanho pequeno, curto tempo de vida e a fácil manipulação genética (ARRESE e SOULAGES, 2010).

A forma do corpo gorduroso como um tecido depende de vários fatores, como: lâmina basal, junções celulares e o formato de cada célula determinado pelo seu citoesqueleto. É constituído principalmente por adipócitos, mas também podem estar presentes os enócitos, micetócitos e urócitos. Em *Leptinotarsa decemLineata* (Coleoptera), por exemplo, o corpo gorduroso consiste de pequenos lóbulos próximo das gônadas e tegumento (PRAKASH, 2008).

Adipócitos ou trofócitos são os principais componentes do corpo gorduroso e são caracterizados morfológicamente pela presença de gotas lipídicas, rosetas de glicogênio e componentes protéicos (DEAN et al., 1985; ARRESE e SOULAGES, 2010). Os triglicerídeos são os principais componentes das gotas lipídicas, sendo que estas não são somente um reservatório passivo de lipídios, mas sim estruturas dinâmicas que possuem um papel central no metabolismo de lipídios para geração de energia (ARRESE e SOULAGES, 2010).

Em insetos o ácido úrico é transportado para o lúmen dos túbulos de Malpighi, mas também pode ser encontrado armazenado em outros tecidos, como o corpo gorduroso. Em gafanhotos e baratas as células que armazenam o ácido úrico são os urócitos (ARRESE e SOULAGES, 2010). O citoplasma dessas células consiste principalmente de grandes vacúolos que contêm cristais de ácido úrico ou urato. Sugere-se que o ácido úrico armazenado nos vacúolos dessas células não é somente direcionado para a excreção, mas também pode servir como uma reserva de nitrogênio que é mobilizada pelo corpo gorduroso (PRAKASH, 2008).

Muitas espécies possuem microrganismos intracelulares dentro de células especializadas, chamadas de micetócitos. Assume-se que essa é uma relação simbiótica e que é requerida para o desenvolvimento normal do indivíduo na ausência de suplementos

alimentares. Frequentemente os micetócitos também possuem glicogênio armazenado (PRAKASH, 2008).

Enócitos são células de origem ectodermal e geralmente são associados com a epiderme, mas também podem estar associados com a camada periférica do corpo gorduroso. Em indivíduos adultos, os enócitos podem conter pigmento amarelo e cristais de ácido úrico. Como nos adipócitos, possuem pequenas regiões de glicogênio (PRAKASH, 2008).

1.3. *Zophobas morio*

Zophobas morio é um besouro conhecido popularmente como tenebrio gigante, pertence à família Tenebrionidae da ordem Coleoptera sendo encontrado na América do Sul e Central e cultivado na Europa e Estados Unidos. Esta espécie é amplamente utilizada na alimentação de animais insetívoros; como escorpiões, aranhas, anfíbios, aves, répteis e macacos; em zoológicos e criadouros. Sua ampla utilização na alimentação de animais de cativeiro é devido ao seu alto valor nutricional e ao cultivo fácil e de baixo custo (SCHULTE, 1996). Os tenebrionídeos possuem hábitos noturnos e geralmente vivem em ambientes xerofílicos (SCHULTE, 1996; COUTO-FERREIRA, 2010).

Besouros apresentam quatro fases de vida distintas: ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos de *Z. morio* possuem forma alongada e coloração esbranquiçada, com comprimento aproximado de 1,7 mm com duração de 8 a 12 dias. As larvas de *Z. morio* possuem exoesqueleto espesso e coriáceo (Fig. 4), quando eclode pode medir até 2,5 mm e, antes de atingir a fase de pupa, podem medir até 6,0 cm. A fase larval pode ser dividida em três etapas, sendo que na primeira etapa a larva apresenta de 2,0 a 2,5 mm com coloração amarelada e na terceira fase a larva possui em torno de 6,0 cm. A pupa apresenta coloração esbranquiçada, corpo rígido e curvado com comprimento em torno de 2,0 cm e tem duração de 11 a 17 dias. O indivíduo adulto apresenta coloração preta, possui comprimento de 20 a 40 mm, dimorfismo sexual e pode viver até 1 ano (SCHULTE, 1996; COUTO-FERREIRA, 2010).

Larvas de *Z. morio* são facilmente criadas em laboratório, apresentam fácil dissecação, ciclo de vida curto e alta fecundidade, portanto, fornecem uma boa fonte de material para estudos científicos em geral.



Figura 4: Larva de *Zophobas morio* com aproximadamente 6,0 cm. Fonte: Viviani et al., 2009.

1.3.1. Enzima tipo-luciferase dos túbulos de Malpighi de *Z. morio*

Enzimas tipo luciferase foram encontradas primeiro em larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (VIVIANI e BECHARA, 1996) e uma destas foi clonada dos túbulos de Malpighi de larvas do parente próximo *Z. morio* por Viviani e colaboradores (2009). Esta enzima tipo luciferase pertence à família das AMP-CoA ligases e, embora esteja presente nesta espécie não bioluminescente, apresenta uma fraca atividade luminescente na presença de ATP e D-luciferina de vagalumes (Fig. 5), que para esta espécie constitui um xenobiótico (VIVIANI et al., 2009). Embora a função desta enzima ainda não seja conhecida, algumas evidências apontam seu possível envolvimento na detoxificação de ácidos carboxílicos (PRADO et al., 2016).

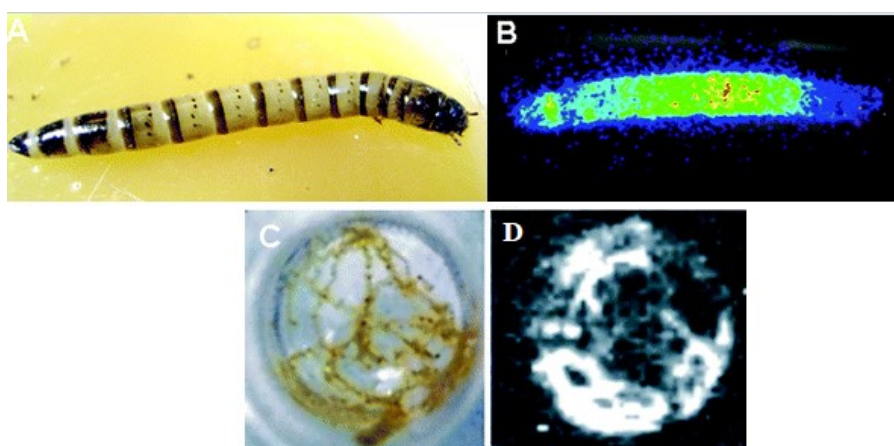


Figura 5: CCD imagem da larva de *Zophobas morio*. A. Imagem real da larva. B. Imagem da quimioluminescência induzida da larva após injeção intracuticular de 100 µl de D-luciferina de vagalume 10 mM em tampão citrato 0,1 M pH 5,0 após 5 min de exposição. C. Túbulos de Malpighi isolados de larvas após injeção de D-luciferina. D. Imagem da quimioluminescência dos túbulos isolados após injeção de D-luciferina obtida após 30 min de exposição em alta sensibilidade. Fonte: VIVIANI et al., 2009.

A superfamília de enzimas das CoA-ligases, também conhecidas como *adenylate-forming enzymes*, está envolvida na ativação de ácidos carboxílicos, que podem atuar em vias biossintéticas e de degradação, transporte através de membranas e no metabolismo de xenobióticos (VIVIANI, 2002). Estas enzimas catalisam a adenilação, em geral seguida da tioesterificação com CoA de substratos carboxílicos, possuindo motivos altamente conservados para a ligação de ATP e motivos variáveis no sítio de ligação do substrato carboxílico (WOOD, 1995; KNIGHTS e DROGEMULLER, 2000; VIVIANI, 2002).

1.4. BIOLUMINESCÊNCIA

A bioluminescência pode ser definida como um tipo de quimioluminescência, biologicamente funcional, que é catalisada por enzimas denominadas luciferases que oxidam compostos genericamente chamados de luciferinas. Os termos luciferina e luciferase são amplamente utilizados e não refletem a origem evolutiva destes compostos, sendo que apresentam sequencias e estruturas químicas diferentes entre os taxa (HASTINGS, 1983). O esquema da Fig. 6 mostra as etapas da reação de emissão de luz pelo processo de bioluminescência em vagalumes. Na reação inicial, a luciferase dos besouros atua como adenil-transferase catalisando a formação de um intermediário adenilato (adenil-luciferina) a partir da ativação da luciferina e utilização de ATP. Na reação 2, a adenil-luciferina reage com oxigênio formando oxiluciferina eletronicamente excitada e dióxido de carbono seguida da emissão de luz (McELROY e DeLUCA, 1978; BRANCHINI et al., 2003).

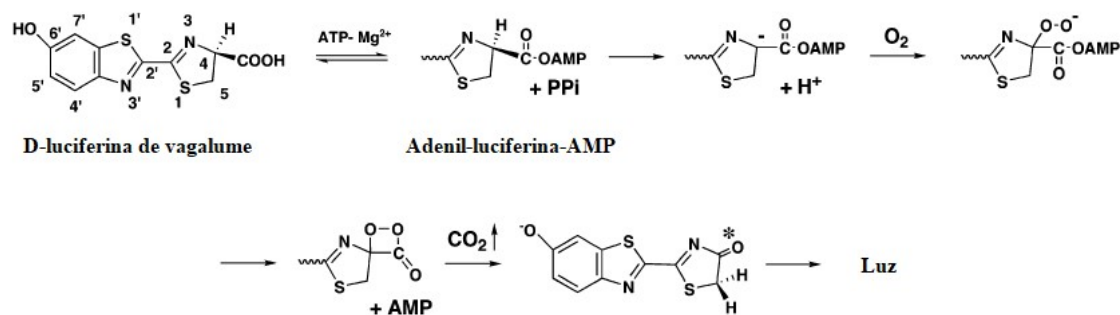


Figura 6: Esquema das etapas da reação de emissão de luz pelo processo de bioluminescência em vagalumes. Adaptado de: BRANCHINI et al., 2003.

Na classe Insecta, espécies bioluminescentes pertencem principalmente às ordens Coleoptera e Diptera. Nos coleópteros, a superfamília Elateroidea inclui as seguintes famílias de espécies bioluminescentes: Elateridae, Lampyridae e Phengodidae/Rhagophthalmidae (COSTA, 2003). A ordem Diptera possui em torno de 150 famílias e 150.000 espécies, entretanto, apesar de sua grande diversidade, o número de espécies bioluminescentes nesta ordem é pequeno e está presente em uma única família, Keroplatidae, que possui em torno de 86 gêneros e 1.000 espécies (YEATES et al., 2007; EVENHUIS, 2006). Apenas três gêneros da família Keroplatidae possuem espécies que são bioluminescentes, *Arachnocampa*, *Keroplatus* e *Orfelia* (VIVIANI, 2002).

1.4.1. Bioluminescência na família Keroplatidae (Diptera)

As espécies dos gêneros *Arachnocampa*, *Keroplatus* e *Orfelia* também são chamadas de *fungus gnats*, termo utilizado para definir insetos que se alimentam de fungos encontrados no solo. Alguns *fungus gnats* da família Keroplatidae podem ser carnívoros, mas nem todos são bioluminescentes. As larvas bioluminescentes destes gêneros são denominadas de *glowworms*, pois são parecidas com vermes. Espécies representativas destes gêneros são encontradas em várias regiões do mundo, como nas Montanhas Apalaches na América do Norte (*Orfelia fultoni*), Suécia, na região de Vogelsberg na Alemanha, Itália, Japão, regiões da América Central (florestas de Honduras e Costa Rica), Andes na região colombiana, entre outros (MEYER-ROCHOW, 2007).

As principais características presentes nas larvas destes gêneros são: comportamento carnívoro, bioluminescência e construção de teias em redes de linha reta, sendo que algumas destas características estão presentes em combinação nas larvas ou apenas uma delas pode ser encontrada dependendo da espécie. Espécies do gênero *Arachnocampa*, por exemplo, possuem as três características citadas (MEYER-ROCHOW, 2007).

O gênero *Keroplatus* possui 26 espécies que estão distribuídas em várias regiões, destas, apenas cinco espécies são conhecidas por emitir uma fraca luminescência na fase larval e de pupa, essas espécies são encontradas no Japão, Europa e Rússia (BACCETTI, 1987; OBA et al., 2011). Nas larvas deste gênero, a bioluminescência é devida a grânulos

proteicos que estão presentes no corpo gorduroso das larvas e pupas (BACCETTI, 1987). Devido a raridade das espécies deste gênero e às poucas observações destas, existem limitados estudos sobre sua biologia e bioluminescência (OSAWA et al., 2014).

Em larvas de *O. fultoni*, as lanternas são formadas por duas camadas de corpos negros, que consistem de grandes células secretoras binucleadas preenchidas por grânulos escuros (BASSOT, 1978; VIVIANI et al., 2002). A luciferase de *O. fultoni* possui cerca de 140 kDa e possivelmente é um heterodímero. A luciferina dessa espécie está associada a um componente protéico de alto peso massa molecular (> 500 kDa), cuja função seria proteger a luciferina da auto-oxidação e de reagir com a luciferase. *In vitro*, a adição de ATP não teve efeito na bioluminescência de *O. fultoni*, já a adição do redutor DTT aumentou significativamente a intensidade da emissão. Acredita-se que o DTT, ou provavelmente outro agente redutor, atue na liberação da luciferina do componente protéico e esta possa reagir com a luciferase (VIVIANI et al., 2002).

Entretanto, estudos sobre o sistema bioluminescente em dípteros são escassos. A variação morfológica e bioquímica dos órgãos bioluminescentes entre os gêneros da família Keroplatidae, indica que a bioluminescência tenha se originado pelo menos duas vezes independentemente durante a evolução (VIVIANI et al., 2002).

1.4.2. Gênero *Arachnocampa* (Keroplatidae: Diptera)

O gênero *Arachnocampa* possui nove espécies, sendo que oito espécies são encontradas na Austrália e Tasmânia, e uma espécie, *A. luminosa* está distribuída na Nova Zelândia (OBA et al., 2011). As espécies de *Arachnocampa* são encontradas em ambientes escuros e úmidos, como margens de rios, cavernas ou próximas a cursos d'água, e as mais conhecidas do gênero são: *A. luminosa*, *A. richardsae*, *A. flava* e *A. tasmaniensis* (MEYER-ROCHOW, 2007).

O nome *Arachnocampa* é devido à capacidade das larvas em produzir teias (*arachno*) e pela semelhança das larvas com vermes (*campa*) (MEYER-ROCHOW, 2007). As glândulas labiais, também denominadas de glândulas salivares, são as responsáveis pela produção da seda neste gênero (Fig. 7) (SUTHERLAND et al., 2010).

A bioluminescência produzida por esses organismos em cavernas forma uma bela paisagem que atrai turistas de todo o mundo. A espécie *A. luminosa* atrai milhares de turistas para a caverna de Waitomo, Nova Zelândia, sendo esta espécie uma importante

fonte de renda e emprego para a região. Uma importante abordagem é o impacto dos visitantes no ambiente natural dessas espécies. A presença humana em cavernas pode alterar fatores ambientais, como: gases, umidade, intensidade luminosa, temperatura e o suprimento alimentar de pequenos insetos voadores para as larvas. Alterações no suprimento de insetos para alimentação também podem ocorrer no exterior de cavernas, em particular mudanças nas margens e cabeceiras dos rios que chegam ao interior das cavernas, pois são nesses ambientes que muitos insetos se reproduzem (MEYER-ROCHOW, 2007).

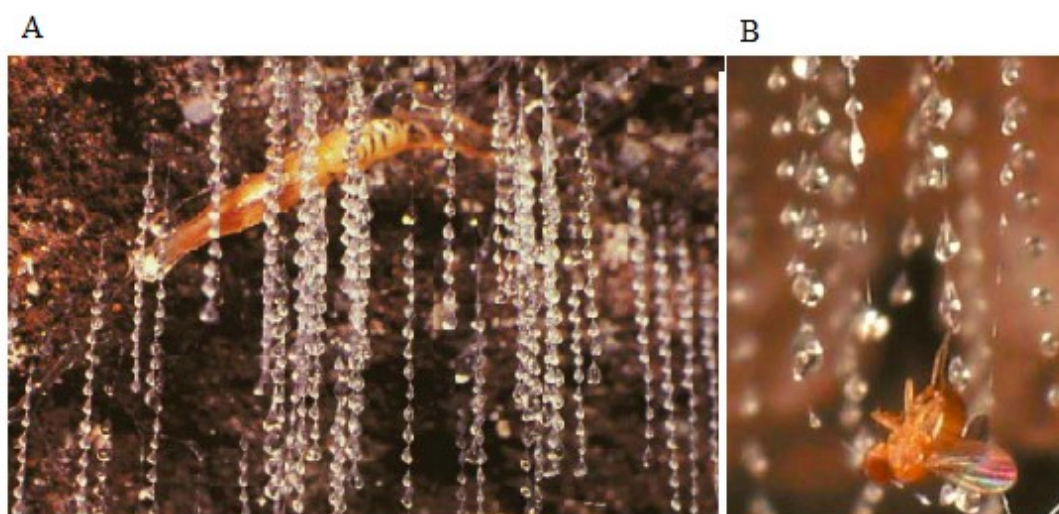


Figura 7: Fotografias do teto de uma caverna, mostrando (A) larva de *Arachnocampa luminosa* em suas teias viscosas e (B) um pequeno inseto voador preso nessas teias. Adaptado de: MEYER-ROCHOW, 2007.

1.4.3. Lanternas de *Arachnocampa* spp. se originaram da especialização dos túbulos de Malpighi

As larvas do gênero *Arachnocampa* emitem luz azul por lanternas que estão localizados na extremidade posterior do corpo. O órgão bioluminescente destas espécies deriva da porção terminal dos túbulos de Malpighi e está localizado no interior de um tecido respiratório que é constituído por finos tubos de fundo cego, estes tubos são denominados de traqueolas e são responsáveis pelo suprimento de oxigênio nos órgãos internos dos insetos. O tecido respiratório onde o órgão luminoso está presente atua também como refletor, orientando e amplificando a luz emitida. O controle da bioluminescência é feito através de um gânglio nervoso no sétimo segmento do corpo via nervos terminais. As larvas são capazes de cessar a emissão de luz quando há distúrbios, como por exemplo, luz intensa (MEYER-ROCHOW, 2007).

O sistema fotogênico encontrado em *Arachnocampa* compreende uma pequena luciferase com cerca de 57 kDa e uma luciferina que fluoresce em 410 nm. O pico de intensidade de luz do extrato de uma larva é da ordem de $10^7 - 10^9$ fotons/s. A emissão de luz é ativada por MgATP, como ocorre em vagalumes, embora os sistemas sejam bioquimicamente e evolutivamente distintos (VIVIANI et al., 2002). A análise por espectrometria de massas dos extratos de lanternas parcialmente purificados revelou que uma das principais bandas excisadas corresponde a enzimas AMP-CoA ligases/enzimas tipo luciferase (57 kDa) (SILVA et al., 2015b) e uma enzima tipo luciferase foi clonada pelo Prof. Dr. Vadim Viviani. Trowell e colaboradores (2016) descreveram a clonagem e caracterização de uma luciferase de cerca de 59 kDa em *A. richardsae*.

Em um estudo sobre a morfologia e fisiologia dos túbulos de Malpighi de *A. luminosa*, distinguiu-se quatro regiões morfológicamente distintas nos túbulos desta espécie, cada uma destas regiões sendo constituída por tipos celulares distintos, Tipo I, II, III e IV. As células da região proximal dos túbulos (Parte 1) são denominadas Tipo I, as células Tipo II são grandes e estão localizadas na Parte 2 e a Parte 3 é constituída por células pequenas (Tipo III) (GREEN, 1979a). A região responsável pela bioluminescência é denominada Parte 4 e é composta pelas células Tipo IV, que apresentam maior tamanho e formam o órgão luminoso, tanto as superfícies ventral e lateral são cobertas por uma camada de tecido hipertrofiado do epitélio traqueal (GREEN, 1979b).

Em relação à ultraestrutura das células Tipo IV é notável a ausência de complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso, sendo que a principal característica dessas células são suas mitocôndrias, que são organelas grandes e aleatoriamente distribuídas. As células do Tipo IV são bem diferentes das outras células presentes nas outras três regiões dos túbulos, elas não possuem as características presentes em células epiteliais de transporte, como a pouca ocorrência de invaginações na membrana apical e basal. As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela produção de ATP no interior das células, tanto que seu tamanho grande e desenvolvimento da crista são indicadores de atividade celular intensa. As mitocôndrias das células Tipo IV são similares em aparência às mitocôndrias que circundam os traqueolos nos fotócitos de vagalumes, sugerindo que as células do Tipo IV de *A. luminosa* possuem a mesma função dos fotócitos de vagalumes (GREEN, 1979a).

2. JUSTIFICATIVA

A análise transcricional dos túbulos de Malpighi e do corpo gorduroso de larvas do tenebrionídeo *Zophobas morio* trará importantes informações sobre as atividades enzimáticas e a fisiologia molecular destes tecidos em coleópteros de uma forma geral. Considerando que o transcriptoma dos túbulos de Malpighi e do corpo gorduroso de várias espécies, como *Drosophila melanogaster* (WANG et al., 2004; JIANG et al., 2005) e *Aedes aegypti* (PRICE et al., 2013; LI et al., 2017), já foram sequenciados, existe um banco de dados rico para comparação de genes expressos em *Z. morio* e a inferência de suas funções nestes tecidos.

Além do interesse em compreender melhor a fisiologia dos túbulos de Malpighi em coleópteros, estudos anteriores identificaram a presença de enzimas tipo luciferases nos túbulos e no corpo gorduroso de espécies de Coleoptera (VIVIANI e BECHARA, 1996; VIVIANI et al., 2009). A função dessas enzimas nos túbulos é desconhecida, pois com a exceção de luciferases de besouros, estudos sobre a função das enzimas AMP-CoA ligases em insetos são praticamente ausentes. Além disso, a necessidade de ATP e a ocorrência de enzimas tipo luciferases no sistema bioluminescente do díptero *Arachnocampa*, cujas lanternas derivam do túbulos de Malpighi, indicam a possibilidade da existência de uma relação evolutiva entre túbulos, AMP-CoA ligases e origem da bioluminescência em dípteros. Assim, uma comparação do transcriptoma dos túbulos de Malpighi de larvas de *Z. morio* e do transcriptoma de lanternas do díptero *Arachnocampa* poderão auxiliar na compreensão da diversificação molecular e funcional dos túbulos de Malpighi, especialmente a origem da bioluminescência em Diptera.

3. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram: (1) comparar o transcriptoma dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de larvas de *Z. morio*, para identificar atividades enzimáticas e melhor entender a fisiologia molecular destes tecidos em besouros; (2) investigar a presença de AMP-CoA ligases e inferir sua função nestes tecidos, e (3) comparar o transcriptoma dos túbulos de Malpighi com o transcriptoma das lanternas do díptero *Arachnocampa*, para melhor entender a diversificação funcional dos túbulos de Malpighi e analisar a existência de um possível elo evolutivo entre AMP-CoA ligases, túbulos de Malpighi em lanternas e origem anatômica e bioquímica da bioluminescência em Diptera.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Os primeiros exemplares das larvas de *Z. morio* para criação foram doadas pelo Biotério do Instituto de Biociências da Unesp - Rio Claro e mantidas em local protegido da incidência de luz. As larvas foram alimentadas com farelo de trigo e farinha de mandioca.

4.2. ISOLAMENTO DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO DE LARVAS de *Z. morio*

Os túbulos de Malpighi e corpo gorduroso foram isolados das larvas de *Z. morio*, previamente anestesiadas com clorofórmio, com o auxílio de um estereomicroscópio modelo 37081 (Carl Zeiss, Alemanha). As larvas selecionadas para a isolamento dos tecidos tinham em torno de 5 cm a 6 cm, estando em seu terceiro e último estágio larval. Foram extraídos os túbulos de aproximadamente 100 larvas e o corpo gorduroso de 20 larvas, obtendo-se em torno de 50 mg de cada tecido. O isolamento dos tecidos foi realizado cuidadosamente para evitar a extrusão do líquido intestinal para que não houvesse contaminação da amostra. Os túbulos e corpo gorduroso isolados foram imediatamente colocados em gelo seco e mantidos a -80° C.

4.3. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO

A extração de RNA total foi realizada com a utilização do reagente Trizol[®], conforme o protocolo sugerido pelo fornecedor (Life Technologies, Estados Unidos). Os túbulos e corpo gorduroso extraídos de larvas de *Z. morio* foram macerados com Trizol[®] na proporção de 1 mL do reagente para cada 50 mg de tecido. Durante a maceração, o reagente utilizado mantém a integridade do RNA e concomitantemente rompe as células e componentes celulares.

Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a 4° C. O precipitado resultante; constituído de polissacarídeos, membranas extracelulares,

DNA de alto peso molecular; foi descartado. O sobrenadante, que contém o RNA, foi transferido para um novo microtubo e foi incubado à temperatura ambiente por 5 min para a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Para a separação de fases adicionou-se 200 µl de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol[®] utilizado na maceração. As amostras foram vigorosamente agitadas durante 15 segundos, incubadas à temperatura ambiente por 3 min e centrifugadas a 12000 rpm por 15 min a 4° C. Após a centrifugação ocorreu a separação de fases; uma fase inferior que é constituída de fenol e clorofórmio, interfase e uma fase superior que é aquosa e contém o RNA total (mistura de RNA transportador, RNA ribossômico, RNA mensageiro e pequenos RNAs nucleares). A fase aquosa possui em torno de 60% do volume de Trizol[®] utilizado na maceração e o volume foi cuidadosamente transferido para um novo microtubo.

Adicionou-se à fase aquosa 500 µl de isopropanol 100% para cada 1 mL de Trizol[®] para que ocorresse a precipitação do RNA. As amostras foram homogeneizadas, incubadas à temperatura ambiente por 10 min e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a 4° C. Foi adicionado ao RNA precipitado 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de Trizol[®] utilizado na maceração do tecido. Nesta etapa, o RNA pode ser armazenado por até um ano a -80° C. O RNA total previamente extraído de cada um dos tecidos, foi centrifugado a 7.500 rpm por 5 min a 4° C, o etanol 75% foi descartado e o RNA eluído em 20 µl de água tratada com DEPC. Obteve-se 91 µg de RNA total dos túbulos e 66,08 µg do corpo gorduroso. O RNA total extraído dos túbulos e corpo gorduroso foi utilizado para o sequenciamento do transcriptoma e obtenção do cDNA destes tecidos para reações de PCR .

4.4. TRANSCRIPTOMA POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO DE *Z. morio*

O sequenciamento do transcriptoma (RNA-seq) dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *Z. morio* foi realizado pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) utilizando o RNA mensageiro destes tecidos. A pureza das amostras de RNA total foi analisada espectrofotometricamente pela razão da absorção OD₂₆₀/OD₂₈₀ no equipamento *NanoVue Plus* (Healthcare Bio-Science, Suécia) e a integridade das

amostras foi analisada no *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Estados Unidos), ambos medidos no LaCTAD.

4.4.1. Construção de biblioteca de cDNA *paired-end* Illumina e sequenciamento

A construção das bibliotecas e seu sequenciamento foram realizados pelo LaCTAD usando o kit *TruSeqRNA Sample Preparation Kit* (Illumina, Estados Unidos), de acordo com o protocolo do fornecedor. RNAs mensageiros que continham a cauda poli-A foram purificados usando oligo(dT) com *beads* metálicas e fragmentados em segmentos de 200 a 500 pb. A partir do *pool* de RNAs clivados foi sintetizada a primeira fita do cDNA, utilizando o kit *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies, Estados Unidos) e iniciadores aleatórios. A segunda fita foi sintetizada utilizando o reagente *Second Strand Master Mix* e incubação das amostras a 16° C por 1 hora. Após a síntese da segunda fita de cDNA, os fragmentos foram repareados e adaptadores foram ligados as pontas. As amostras foram purificadas e passaram por mais uma etapa de amplificação com o objetivo de enriquecimento de sequências nas amostras. O *pool* de cDNA das duas amostras foi sequenciado no equipamento Illumina HiSeq2500 (Genomics Core, Bélgica).

4.4.2. Montagem *de novo* dos transcriptomas

As sequências inicialmente passaram por um controle de qualidade, por meio do *software* FastqC 0.11.5 (ANDREWS, 2010). Em seguida, foram editadas com o pacote FASTX-TOOLKIT 0.013 para remoção de adaptadores e *reads* de baixa qualidade (PEARSON et al., 1997).

Após o processo de edição, os transcriptomas foram montados utilizando o *software* Trinity, que combina três módulos independentes: *Inchworm*, *Chrysalis* e *Butterfly* (GRABHERR et al., 2011). As montagens foram realizadas no cluster *Data Intensive Academic Grid* (DIAG) pertencente à Universidade de Maryland (Estados Unidos). As corridas foram realizadas utilizando sequências *paired-end*, com o *K-mers* fixado em 25, com tamanho mínimo de sequências de 200 pb, utilizando 32 CPUs e memória de 100 Gbytes. Os transcritos montados foram traduzidos em sequências de

aminoácidos utilizando a ferramenta TransDecoder presente no *software* Trinity, com sobreposição das sequencias que apresentaram mais de 95% de identidade.

4.4.3. Anotação dos transcritos, análises computacionais das sequencias e cálculo da abundância

As seqüências de aminoácidos foram sujeitas a buscas de similares com outras proteínas por meio do algoritmo Blastp não redundante (nr) e UNIPROT/SWISS-PROT, obtidos dentro do *software* Blast2GO (CONESA et al., 2005). Foram excluídas das análises sequências com $e\text{-value} \leq 10^{-5}$. A anotação dos termos do *Gene Ontology* (GO) foi realizada com $e\text{-value} < 10^{-6}$, $cut\text{-off} > 55$ e graficamente expresso usando o *software* WEGO (YE et al., 2006). As vias metabólicas foram determinadas por meio do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) utilizando o número EC (Comissão de Enzimas) dos transcritos. A abundância dos transcritos de cada tecido foi comparada por meio dos valores de *Fragments per Kilobase Million* (FPKM), calculado usando o *script align_and_estimate_abundance.pl* presente no pacote do Trinity.

Sequencias aminoácidos selecionadas foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W 1.8 (HIGGINS et al., 2004) no *software* MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o *software* MrBayes 3.2 (RONQUIST et al., 2012) e o melhor modelo evolucionário foi predito pelo ProtTest (ABASCAL et al., 2005). As análises do MrBayes correram duas vezes para 10.000.000 gerações, amostrando árvores a cada 1.000 gerações. Foram descartadas 25% das primeiras árvores e as restantes foram concatenadas para criar a árvore *consesus*, usando probabilidades posteriores como os valores suportados pelos ramos. As árvores foram visualizadas usando o *software* FigTree v.1.3.1 (RAMBAUT, 2007)

4.5. OBTENÇÃO DO cDNA DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO

A obtenção do cDNA dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso foi realizada por meio da utilização do *kit* de *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido). Após a extração do RNA total de acordo com o item 4.3, 8,0 µl da amostra de RNA total de cada tecido, aproximadamente 2 µg de RNA total,

foram tratados com 1,0 µl de DNase I (2 U/µl) e 1,0 µl de tampão DNase I (Tris 100 mM pH 7,5, MgCl₂ 25 mM, CaCl₂ 5mM), e mantidos por 30 min a 37° C. Após essa etapa foi adicionado 1,0 µl de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,5 M à cada amostra e aquecidas a 65° C durante 10 min. Acrescentou-se 0,5 µl de oligo (dT) 500 µg/mL e aquecimento a 65° C por 10 min. O protocolo descrito a seguir foi preparado para cada tecido para a obtenção do cDNA de acordo com o protocolo do fornecedor: 10 µl de RNA total (aprox. 2 µg de RNA total), 2,0 µl de tampão transcriptase reversa, 0,8 µl de dNTP Mix (100 mM), 2,0 µl de *primer* (oligonucleotídeos iniciadores) randômico, 1,0 µl da enzima de transcrição reversa 50 U/µl e 4,2 µl de água ultrapura, no volume final de 20 µl. As reações foram mantidas nas seguintes temperaturas e tempo: 25° C por 5 min, 37° C por 120 min, 85° C por 5 min. Os cDNAs obtidos foram utilizados para a amplificar genes de interesse nestes tecidos.

4.6. AMPLIFICAÇÃO DE AMP-CoA LIGASES DOS TÚBULOS DE MALPIGHI

Sequências que possuem a inferência de serem AMP-CoA ligases dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso foram amplificadas com os pares de *primers* da Tabela 1. Os pares de *primers* foram desenhados a partir das sequências de *Z. morio* obtidas no sequenciamento do transcriptoma dos túbulos e corpo gorduroso por meio da ferramenta *online* do *Integrated DNA Technologies*, disponível em <http://www.idtdna.com/scitools/applications/realtimepcr/>. As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se o *kit PCR Master Mix* (Promega, Estados Unidos), de acordo com o protocolo do fabricante cada reação deve conter 12,5 µl de *PCR Master Mix* (*Taq* DNA polimerase 50 U/ml, dNTPs 400 µM, MgCl₂ 3 mM, tampão *Taq* DNA polimerase), 1 µl de DNA *template*, 1 µl de cada *primer* 10 µM, completando-se com água ultra pura estéril para 25 µl. Se necessário, adicionou-se MgCl₂ (25 mM) quando a amplificação foi ausente.

As reações foram submetidas aos seguintes ciclos: etapa inicial de desnaturação a 95° C por 5 min, 30 ciclos de 95° C por 30 segundos (desnaturação), 55° C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão), e uma etapa final de extensão a 72° C por 10 min no termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapura). Se necessário, a temperatura de anelamento foi alterada. Os resultados das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (peso/volume) em tampão de

corrida TAE 1X (Tris-acetato 20 mM e EDTA 0,5 mM) e reveladas em transluminador UV. Foi utilizado padrão de peso molecular de 1 kb (Bio-Rad, Estados Unidos).

Tabela 1: Sequências nucleotídicas dos *primers* usados na amplificação de 4-cumarato-ligases dos túbulos de Malpighi (MT) e corpo gorduroso (CG) de *Z. morio*. Onde F refere-se a sequência sense dos *primers* (forward) e R sequência anti-sense (reverse).

<i>Primer</i>	Sequências (5' - 3')
Ligase MT	F AAG AAC CAG AGG TGG TCG
	R AAT GGT CAG ACA GAA CAG C
Ligase CG	F AAT GGT CAG ACA GAA CAG C
	RCAC TAC CAC CTG TTT TGA TC

4.7. ANÁLISE TRANSCRICIONAL DA BIBLIOTECA DE cDNA DAS LANTERNAS DE LARVAS BIOLUMINESCENTES DE *A. luminosa* (DIPTERA: KEROPLATIDAE)

4.7.1. Biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA das lanternas de *A. luminosa* foi anteriormente construída em vetor λ UNI-ZAP II pelo Prof. Dr. Vadim Viviani na Universidade de Harvard (Estados Unidos). Lanternas de aproximadamente 270 larvas obtidas da Nova Zelândia foram excisadas e extraídas em Trizol[®], de acordo com protocolos estabelecidos. Em torno de 230 μ g de RNA total foram obtidos e após purificação com oligo (dT), foi coletado 2 μ g de mRNA que foi utilizado para construir uma biblioteca de cDNA em λ UNI-ZAP II (Stratagene, Estados Unidos). O título da biblioteca foi cerca de $2 \cdot 10^5$ pfu.

4.7.2. Excisão da biblioteca de cDNA na forma plasmidial

Previamente, a biblioteca na sua forma de fago foi utilizada para transfectar bactérias *Escherichia coli* XL1-Blue para produção de uma biblioteca plasmidial (*pBluescript*). Uma colônia de *E. coli* SOLR foi inoculada em 5mL de meio LB/kanamicina 50 mg/mL e cultivada a 37° C com agitação 200 rpm durante a noite. Subsequentemente, 1 mL da pré cultura foi adicionado em 50mL de meio LB líquido contendo 500 μ l de MgSO₄ 10 mM e 500 μ l de maltose 20%. Esta cultura foi crescida a 37° C com agitação de 200 rpm até a absorbância em 600 nm igual a 1,0. Em um

microtubo, 200µl da cultura de bactérias foram misturados à 10 µl da excisão na forma plasmidial e incubada a 37° C por 15 min. Após a incubação, 50 ul da mistura foram plaqueados em LB ágar/Ampicilina 100 ug/mL, IPTG 0,4 mM e X-Gal 10 ug/mL e mantidos a 37° C por 24 horas. As colônias recombinantes foram selecionadas por meio da coloração. Quando o inserto está presente o gene LacZ, responsável pela síntese da β-galactosidase, é inativado e não ocorre a síntese desta enzima. Deste modo, o X-Gal não é degradado e as colônias produzidas são brancas; na ausência do inserto a β-galactosidase é produzida e o X-Gal é degradado produzindo colônias azuis.

4.7.3. Extração de DNA plasmidial das colônias recombinantes

As colônias brancas, que continham inserto de cDNA, foram selecionadas para a extração de DNA plasmidial. Para isto, cada colônia foi cultivada em 5mL de LB líquido/Ampicilina 100µg/mL a 37° C sob agitação de 200 rpm durante a noite.

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o isolado com kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* de acordo com o protocolo da empresa (Promega, Estados Unidos). Desta cultura, 1,5 mL foram centrifugados por 5 min a 4000 rpm para remoção do meio de cultura. O precipitado resultante foi ressuspensão e as células foram lisadas, solução de Ressuspensão e de Lise, respectivamente. Para a degradação das proteínas foi adicionado proteinase K e incubação por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi neutralizada e ajustada para condições ótimas de ligação do DNA à membrana de purificação com solução Neutralizante.

Após a neutralização, a solução foi centrifugada por 10 min a 12000 rpm em temperatura ambiente. O DNA plasmidial presente no sobrenadante foi então cuidadosamente transferido a uma coluna de retenção e adsorvido seletivamente a resina. Esta coluna foi centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto e após o fluxo da solução, a coluna foi lavada com etanol para remover as impurezas. Após nova centrifugação, o DNA, agora puro, foi eluído com água ultrapura estéril e armazenado a -20° C.

A análise do DNA plasmidial foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de corrida TAE 1X. Foi utilizado padrão de peso molecular de 1 kb (Bio-Rad, Estados Unidos). A análise dos insertos foi realizada por eletroforese em de agarose após digestão com a enzima *EcoRI*.

4.7.4. Sequenciamento dos clones aleatoriamente selecionados

As amostras de plasmídeos foram sequenciadas no departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP - Jaboticabal, de acordo com o método de terminação dideoxi de Sanger, utilizando um sequenciador ABI PRIS[®] 3100GeneticAnalyzer (Hitachi).

4.7.5. Análise bioinformática

Os eletroferogramas obtidos do método de terminação dideoxi de Sanger foram editados e lidos com o programa Bioedit versão 7.1. (HALL, 1999). As sequências foram submetidas à análise comparativa com sequências homólogas depositadas no NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do programa BLAST (blastx e tblastx). As sequências que foram submetidas à análise comparativas e tiveram *e-value* <10⁻⁵ foram classificadas de acordo as categorias do GO, por meio do banco de dados *Universal Protein Resource* (UniProt) utilizando o parâmetro *Protein Knowledgebase* (UniProtKB).

4.7.6. Sequenciamento completo e análise bioinformática das hexamerinas e enzimas tipo luciferase da biblioteca de cDNA das lanternas de *A. luminosa*

Os genes que correspondem à hexamerinas e AMP-CoA ligases foram amplificados utilizando os pares de *primers* universais: M13-20/M13R e internos específicos (Tabela 2), na concentração inicial de 10 µM, conforme protocolo do item 4.6. Após amplificação, foram sequenciadas conforme item 4.7.4.

Os eletroferogramas resultantes foram editados e lidos com o programa BioEdit 7.1. (HALL, 1999), sendo que foram sequenciados em torno de 600 pares de bases. As sequências foram submetidas à análise comparativa com sequências homólogas depositadas no banco de dados NCBI por meio dos algoritmos Blastn e Blastx.

As análises filogenéticas das sequências de aminoácidos deduzidas de hexamerinas e de AMP-CoA ligases foram realizadas de acordo com o tópico 4.4.3

Tabela 2: Sequências nucleotídicas dos *primers* usados na amplificação e sequenciamento das enzimas tipo luciferase e hexamerinas das lanternas de *A. luminosa*. Onde F refere-se a sequência sense dos *primers* (*forward*), e R sequência anti-sense (*reverse*).

<i>Primer</i>	Sequências (5' - 3')
Lig Arach F	F CAT CAG GTA CAA CTG GTT TG
Lig Arach R	R TCT CCA GTG TTT ACA TAT CC
292 Hex R	R CAC CAA AGT TGT AGA ATT TC
292 Hex F	F TAT GCC ACT GGA TAT GAT C
514 Hex R	R TTT CAA TTC AAC CAC CCA AC

5. RESULTADOS

5.1. MONTAGEM *DE NOVO* DOS TRANSCRIPTOMAS DOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO E ANOTAÇÃO FUNCIONAL

O sequenciamento do transcriptoma dos túbulos de Malpighi do tenebrionídeo *Z. morio* resultou em 120.725.292 *reads* e do corpo gorduroso 45.350.638 *reads*. Após o processamento dos dados e a montagem *de novo* dos transcriptomas, foram obtidos 66.698 *contigs* nos túbulos e 91.799 no corpo gorduroso. Após a sobreposição das sequências que possuíam identidade > 95%, os túbulos apresentaram 22.242 transcritos não redundantes e o corpo gorduroso 18.589.

Para validação e anotação dos transcritos montados, foi realizada a busca por sequências similares por meio do BLASTp nos bancos de dados NCBI's (não redundante) e Uniprot/Swiss-prot que estão presentes no *software* Blast2GO (Tabela 3). Em ambos os tecidos muitos transcritos não mostraram nenhuma similaridade com sequências disponíveis no banco de dados (3.559 nos túbulos e 2.268 no corpo gorduroso). Isso indica que muitos genes/proteínas são ainda desconhecidos, sendo que eles podem estar envolvidos em importantes funções nesses tecidos. Tanto nos túbulos como no corpo gorduroso, a anotação dos *hits* em termos de distribuição de espécies foi similar principalmente aos produtos gênicos do *Tribolium castaneum* (Coleoptera), que é uma espécie filogeneticamente próxima de *Z. morio*.

Tabela 3: Blast hits e anotação das sequências de cada tecido analisado de *Z. morio*.

Banco de dados		Túbulos de Malpighi	Corpo gorduroso
NCBI	<i>Blast hits</i>	18595 (83,6%)	16320 (87,8%)
	Anotação	8782 (39,48%)	7996 (43,01%)
SwissProt	<i>Blast hits</i>	14311 (64,34%)	13295 (71,52%)
	Anotação	10908 (49,04%)	9178 (49,37%)

Os transcritos foram classificados de acordo com as três categorias do GO: processo biológico (série de evento molecular com início e fim definidos), função molecular (atividade elementar do produto gênico no nível molecular) e compartimento celular (localização a nível subcelular e complexos macromoleculares). A Tabela 4

indica o número de transcritos de cada tecido que puderam ser classificados em cada categoria e as Figs. 8 e 9 mostram as categorias do GO com maior número de transcritos de cada tecido. Alguns transcritos podem atuar em múltiplos processos celulares, deste modo, existe alguma redundância entre as categorias. Muitas proteínas ainda não tiveram suas funções previstas, portanto, análises gênicas, como o transcriptoma, podem trazer importantes informações de proteínas no tecido alvo, mas ainda são necessários realizar estudos funcionais para melhor inferir função fisiológica no tecido onde são encontradas.

Tabela 4: Número de transcritos dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de larvas de *Z. morio* que foram classificados de acordo com as categorias do GO .

Categoria do GO	Túbulos de Malpighi	Corpo gorduroso
Processo biológico	9.218	9.363
Função molecular	12.460	11.346
Compartimento celular	4.644	4.749

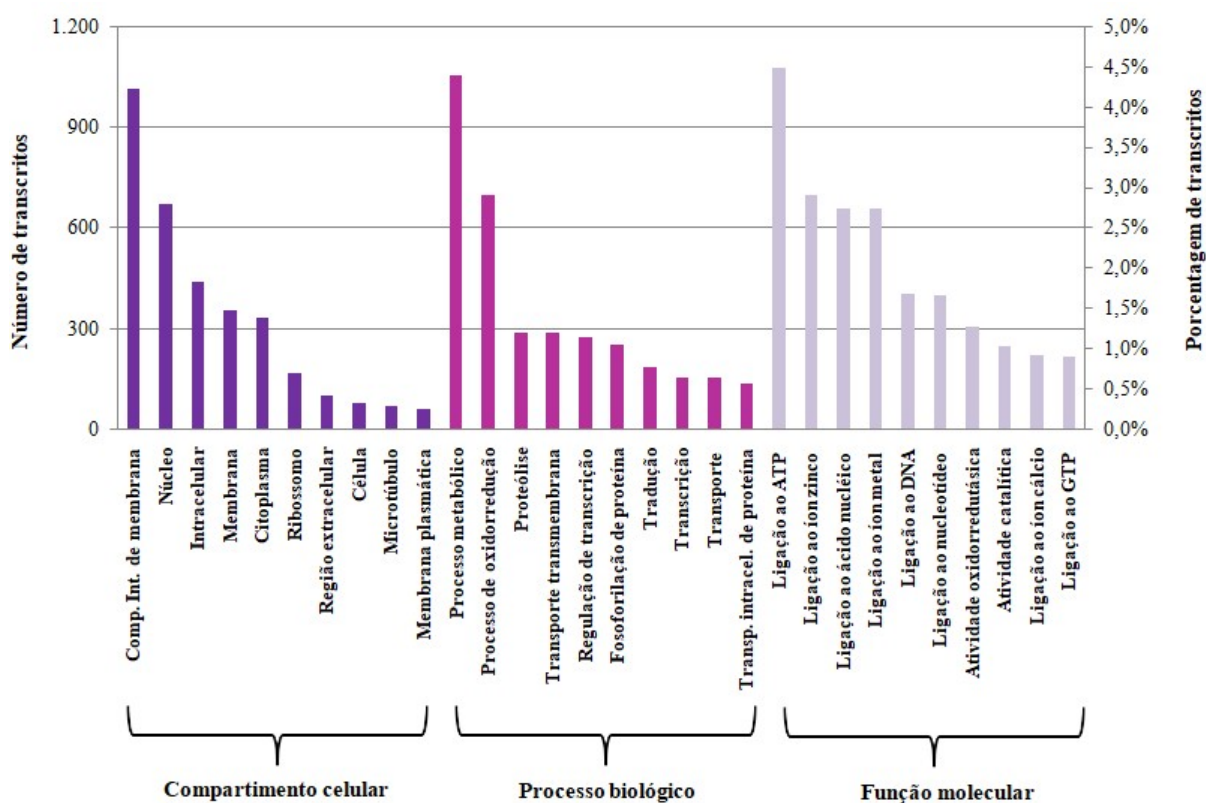


Figura 8: Anotação do GO dos transcritos dos túbulos de Malpighi de larvas de *Z. morio*.

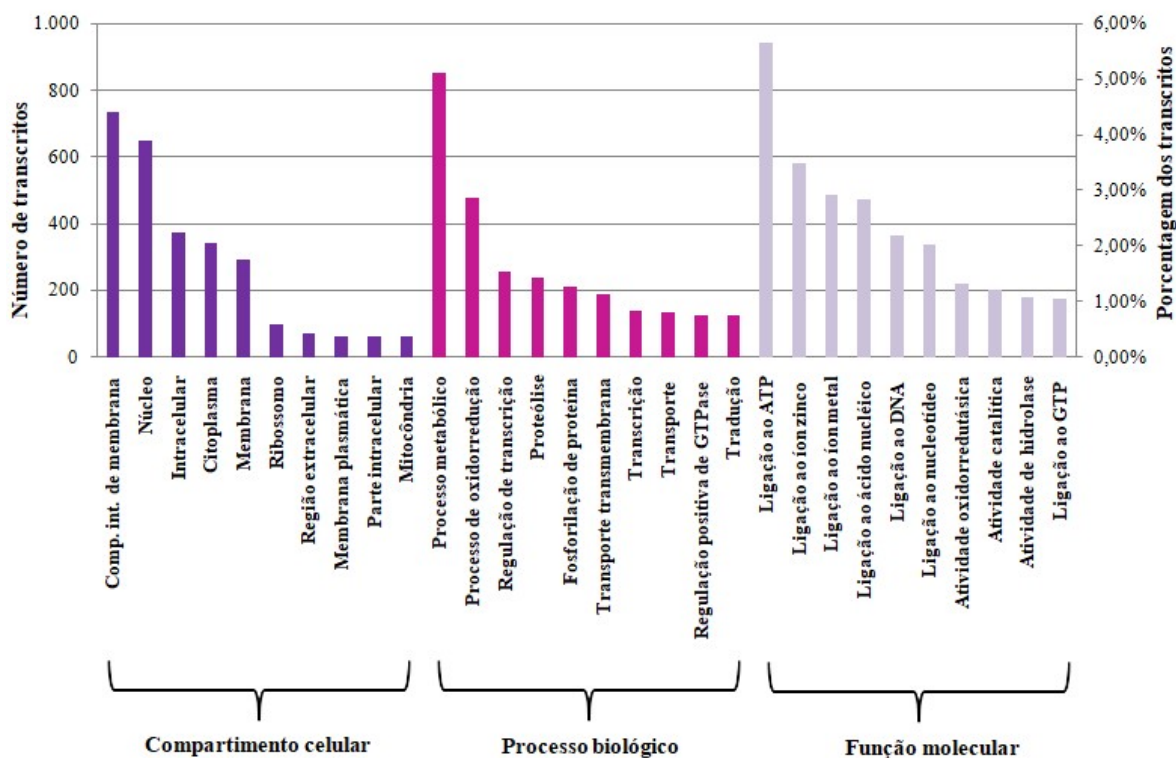


Figura 9: Anotação do GO dos transcritos do corpo gorduroso de larvas de *Z. morio*.

Ambos os tecidos possuem a maior parte dos transcritos classificados nas mesmas categorias do GO. Em termos de função molecular, a maior parte dos transcritos são classificados como proteínas de ligação; em termos de compartimento celular as categorias componente integral de membrana e núcleo exibem a maior porcentagem de transcritos e em termos de processo biológico as categorias processos metabólicos e de oxidorredução possuem o maior número de transcritos. Para melhor analisar e comparar os resultados da anotação funcional dos transcritos dos túbulos e do corpo gorduroso foi elaborado um histograma de acordo com a classificação da árvore hierárquica do GO na ferramenta *online* WEGO (Fig. 10).

A análise por meio da ferramenta KEGG resultou em 112 vias metabólicas em que os transcritos dos túbulos estão envolvidos e 115 vias para os transcritos dos corpo gorduroso. Em ambos os tecidos as vias com maior números de transcritos foram: metabolismo de purina, metabolismo de tiamina e biossíntese de antibióticos (Tabela 5). Os tecidos analisados são capazes de metabolizar compostos purínicos para excreção, onde o ácido úrico proveniente do metabolismo de ácidos nucleicos e proteínas é principalmente sintetizado no corpo gorduroso e transportado para os túbulos para armazenamento ou excreção (NATION, 2015).

Em relação ao metabolismo de tiamina, os tecidos exibiram três classes de enzimas (desulfurase, fosfatase e difosfoquinase). As fosfatases e difosfatases catalizam a formação de intermediários fosfatados de tiamina. Tiamina pirofosfato é um co-fator em muitas reações, como a formação de succinil-CoA no ciclo do ácido cítrico para geração de energia nas células. Insetos requerem tiamina em sua dieta na forma de vitamina B5 (CANDY, 1985), e larvas de *Z. morio* tem uma dieta baseada em farelo de trigo que é uma fonte de tiamina.

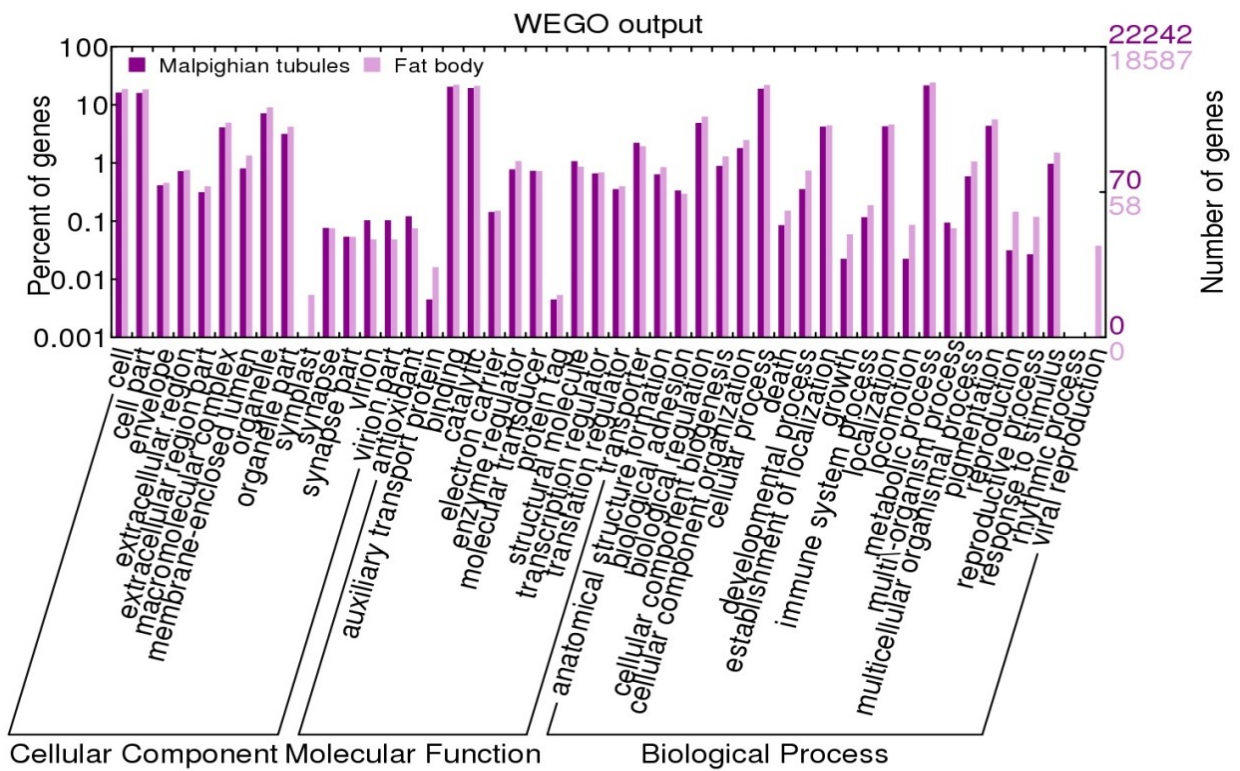


Figura 10: Classificação do GO dos transcritos dos túbulos de Malpighi e do corpo gorduroso de larvas de *Z. morio* pelo WEGO.

Tabela 5: Vias metabólicas nas quais os transcritos dos túbulos de Malpighi e do corpo gorduroso de larvas de *Z. morio* estão relacionados.

Vias dos túbulos de Malpighi	Nº de transcritos	Nº de enzimas na via	Vias do corpo gorduroso	Nº de transcritos	Nº de enzimas na via
Metabolismo de purinas	706	42	Metabolismo de purinas	680	43
Metabolismo de tiamina	547	3	Metabolismo de tiamina	515	3
Biossíntese de antibióticos	178	84	Biossíntese de antibióticos	168	91
Degradação de aminobenzoato	143	4	Metabolismo de pirimidinas	120	22
Via de sinalização receptor celular T	107	2	Degradação de aminobenzoato	105	3
Metabolismo de pirimidinas	106	24	Via de sinalização receptor celular T	84	2
Metabolismo de drogas - outras enzimas	93	11	Metabolismo de glutatona	68	12
Metabolismo de xenobióticos por citocromos P450	65	4	Biossíntese de aminoacil-tRNA	65	22
Metabolismo de glutatona	64	12	Metabolismo de drogas - outras enzimas	65	11
Metabolismo de drogas por citocromos P450	63	4	Metabolismo de xenobióticos por citocromos P450	49	4
Metabolismo de açúcar e aminoácido	62	22	Metabolismo de açúcar e aminoácido	47	20
Metabolismo de amido e sacarose	56	17	Metabolismo de drogas por citocromos P450	46	4
Biossíntese de aminoacil-tRNA	50	21	Ciclo do ácido cítrico	46	16
Glicólise/Gliconeogênese	48	18	Glicólise/Gliconeogênese	39	19
Metabolismo de porfirinas e clorofila	46	11	Degradação de outros glicanos	37	7
Sistema de sinalização de fosfatidilinositol	41	9	Metabolismo de amido e sacarose	36	14
Ciclo do ácido cítrico	38	15	Vias de fixação de carbono em procariotos	35	13
Metabolismo do piruvato	34	15	Sistema de sinalização de fosfatidilinositol	33	10
Metabolismo de cisteína e metionina	34	18	Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	33	18
Degradação de glicanos	34	7	Degradação de lisina	33	5

Os túbulos de Malpighi expressam produtos gênicos envolvidos no transporte de compostos, como cátions e solutos orgânicos, seja para a excreção destes ou para a manutenção normal do funcionamento das células tubulares; metabolismo do nitrogênio e sua posterior excreção; detoxificação de compostos tóxicos; biossíntese de pigmentos oculares; entre outros (DOW e DAVIES, 2001; WANG et al., 2004; DOW e DAVIES, 2006). A Fig. 11 sumariza alguns produtos gênicos relacionados a osmorregulação e excreção, e sua localização celular que foram encontrados em nossa análise.

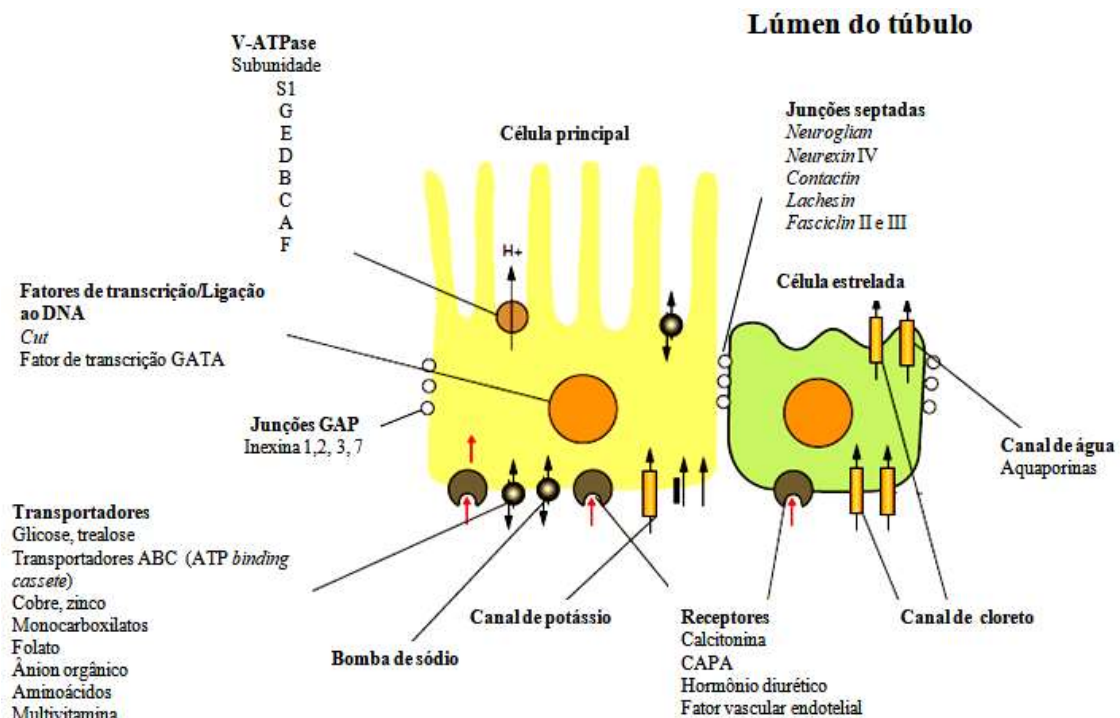


Figura 11: Sumário de alguns produtos gênicos envolvidos nas funções das células tubulares (células principais e estreladas) de larvas de *Z. morio* baseado no modelo proposto para os túbulos de *D. melanogaster*. Adaptado de WANG et al., 2004.

5.2. TRANSCRITOS MAIS ABUNDANTES NOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO

Os transcritos mais abundantes nos túbulos e corpo gorduroso são mostrados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Para comparação, gliceraldeído-3-fosfato (gene constitutivo) exibiu os seguintes valores de abundância (FPKM): 410,26 nos túbulos e 231,47 no corpo gorduroso.

Tabela 6: Transcritos mais abundantes nos túbulos de Malpighi de larvas de *Z. morio*.

ID do transcrito	FPKM	Descrição
comp13348_c1_seq1	92736,94	Proteína sem caracterização
comp14647_c0_seq1	70723,41	Proteína hipotética
comp15982_c3_seq1	35762,77	Proteína sem caracterização
comp15764_c0_seq1	15102,82	Vesícula sináptica glicoprotéica 2b
comp7348_c0_seq1	12199,46	Nenhuma similaridade
comp17006_c0_seq1	9064,49	Citocromo c oxidase subunidade 1
comp19246_c3_seq1	7608,17	Citocromo c oxidase subunidade 3
comp15826_c0_seq1	7546,96	Nenhuma similaridade
comp13348_c1_seq2	6556,69	Proteína sem caracterização
comp19221_c1_seq1	6264,35	Proteína <i>takeout</i>
comp13436_c0_seq1	5650,06	Proteína sem caracterização
comp20473_c0_seq5	5317,06	Proteína <i>takeout</i>
comp11790_c0_seq1	5176,69	<i>Bifunctional nitrilase nitrile hydratase</i>
comp17324_c0_seq2	4437,16	Nenhuma similaridade
comp11847_c0_seq1	4306,82	Nenhuma similaridade
comp17324_c0_seq3	4053,87	Nenhuma similaridade
comp17324_c0_seq1	3957,70	Proteína <i>lazarillo</i>
comp17114_c0_seq1	3303,65	Glutaciona S-transferase sigma
comp16400_c0_seq1	3297,30	Regulador transcricional atrx

Alguns transcritos abundantes dos túbulos não são caracterizados ou conhecidos, e outros já possuem suas funções preditas, como glutaciona S-transferase, proteína *takeout*, proteína *lazarillo* e vesícula sináptica glicoprotéica 2b. Glutaciona S-transferase sigma é uma classe de glutaciona transferase comum em insetos e possui funções constitutivas e no metabolismo de inseticidas (LIU et al., 2015).

Takeout ou proteínas de ligação do hormônio juvenil são ubíquas, mas seu padrão de expressão, regulação e função não são bem compreendidos. Algumas dessas proteínas estão envolvidas em quimiorrecepção na antena e órgãos do paladar (HAGAI et al., 2007). Supõe-se que proteínas *takeout* possuam uma importante função nos túbulos uma vez que são abundantes neste tecido.

A proteína vesícula sináptica glicoprotéica 2b (SV2) pertence à uma grande família de proteínas que são encontradas em vesículas de células neurais ou endócrinas de vertebrados. Essas proteínas podem atuar tanto como neurotransmissores ou transportadores de íon ou glicose (BARTHOLOME et al., 2017). Entretanto, proteínas SV2 já foram identificadas no intestino e túbulos de Malpighi de *Ctenocephalides felis*, e

sugere-se que elas possuam papéis específicos nestes tecidos e possam estar envolvidas em funções diferentes das proteínas de vertebrados (WALMSLER e GAINES, 2004).

A proteína lazarrillo pertence à família de lipocalina de artrópodes, essas proteínas estão relacionadas a várias funções, como: transporte de proteínas e mediação da homeostase celular. Nos túbulos de *Schistocerca americana*, lazarrillo está envolvida no crescimento axonal e orientação. Entretanto, em *D. melanogaster* lazarrillo é relacionada ao balanço do estresse oxidativo (GANFORNINA et al., 2013).

Tabela 7: Transcritos mais abundantes no corpo gorduroso de larvas de *Z. morio*.

ID do transcrito	FPKM	Descrição
comp6951_c0_seq1	52837,30	Precursor de apolipoforina-III
comp11654_c0_seq1	44150,17	Nenhuma similaridade
comp15344_c0_seq1	36223,89	Precursor de hexamerina 1 B
comp16209_c0_seq2	31186,27	Proteína <i>early-staged encapsulation-inducing</i> 56 kDa
comp16209_c0_seq1	22250,28	Proteína <i>early-staged encapsulation-inducing</i> 56 kDa
comp14862_c3_seq1	21795,48	Precursor de hexamerina 2
comp14862_c0_seq1	19660,74	Precursor de hexamerina 2
comp12087_c0_seq1	18537,55	Proteína hipotética
comp14855_c2_seq1	17112,12	Precursor da proteína de estresse hídrico de 28 kDa
comp10564_c1_seq1	15411,23	Precursor da proteína de hemolinfa de 12 kDa
comp14862_c1_seq1	15180,35	Precursor de arilforina
comp14862_c2_seq1	12062,51	Precursor de hexamerina 2
comp13550_c0_seq1	11995,51	Precursor da proteína de hemolinfa de 12 kDa
comp16054_c1_seq1	11967,84	Precursor de hexamerina 4
comp12275_c0_seq2	10810,08	Nenhuma similaridade

Os transcritos mais abundantes no corpo gorduroso são similares à proteínas ou precursores que são sintetizados neste tecido e secretados para a hemolinfa, como hexamerinas, precursor da proteína de estresse hídrico de 28 kDa (dsp28), apolipoforina-III e precursor da proteína de hemolinfa de 12 kDa (Tabela 8). A proteína dsp28 está relacionada na prevenção do dano de dessecação (GRAHAM et al., 1995) e sua abundância pode ser devido as larvas de *Z. morio* serem adaptadas a ambiente seco. O diacilglicerol formado a partir do triacilglicerol no corpo gorduroso está associado à lipoforina (lipoproteína de insetos) na hemolinfa para o seu transporte (CANAVOSO et al., 2001). As hexamerinas em insetos são primariamente relacionadas ao armazenamento de proteína e fonte de aminoácidos em períodos de não alimentação (BURMESTER, 1999; TELFER e KUNKEL, 1991). A proteína *early-staged*

encapsulation-inducing de 56 kDa atua no encapsulamento em resposta à materiais exógenos (CHO et al., 1999).

5.3. ANÁLISE GÊNICA DA BIBLIOTECA DE cDNA DAS LANTERNAS DE LARVAS DE *A. luminosa* (DIPTERA: KEROPLATIDAE)

Durante este a execução deste projeto, com o intuito de melhor compreender a origem da bioluminescência no díptero *Arachnocampa* e suas relações com os túbulos de Malpighi, sequenciamos aleatoriamente cerca de 500 clones da biblioteca de cDNA das lanternas de *A. luminosa*, obtendo-se um total de 430 eletroferogramas que possuíam em torno de 200 a 600 pares de bases e foram analisados comparativamente no NCBI para a busca de sequencias homólogas. Destes, 10% resultaram em nenhuma similaridade com o banco de dados. As sequencias com *e-value* < 10^{-5} foram classificadas de acordo com as três categorias do GO.

Um total de 168 transcritos teve seu processo biológico inferido; 178 foram categorizados para compartimento celular e 263 para função molecular (Fig.12). Para a elaboração do gráfico, foram selecionadas as categorias que possuíam três ou mais transcritos. Ressalta-se que vários produtos gênicos ainda não foram categorizados, pois sua função biológica e molecular permanecem desconhecidas. A maior parte dos transcritos obtidos das lanternas de *A. luminosa* estão envolvidos com a síntese de proteínas (proteínas ribossomais) e os produtos gênicos mais abundantes (28 transcritos) são similares a hexamerinas que em termos de função molecular do GO são categorizadas como proteínas de armazenamento.

5.3.1. Hexamerinas em lanternas de *A. luminosa* e nos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *Z. morio*

Obteve-se nas lanternas de *A. luminosa* em torno de 7% de sequencias similares a *larval serum protein*, uma hexamerina que pertence a uma superfamília de proteínas que engloba profenoloxidasas de artrópodes, hemocianinas de artrópodes, hexamerinas de insetos e receptores de hexamerinas de Diptera (BURMESTER, 1999). Em nossa análise, a maioria das hexamerinas foi similar a *larval serum protein*, XP 001843494.1, de *Culex quinquefasciatus* (Diptera), mostrando aproximadamente 60% de identidade. Nossos

dados também mostram que possivelmente existem duas subunidades diferentes que formam do hexâmero em lanternas de *A. luminosa* e a massa molecular predita para ambas as subunidades foi cerca de 80 kDa. As sequencias peptídicas destas subunidades (clone 292 e clone 514) apresentam 59% de identidade (Fig. 13). Na análise dos transcritos dos tecidos de *Z. morio* foram encontrados sequencias similares à precusores de hexamerinas com massa molecular predita de cerca de 91 kDa. A identidade do alinhamento entre as hexamerinas de *Z. morio* e das lanternas de *A. luminosa* foi 40%. Entre as hexamerinas, 18 aminoácidos são conservados, a região conservada mais notável entre essas proteínas é o motivo TXX(R)DP localizado na porção aminoterminal (BURMESTER et al., 1998).

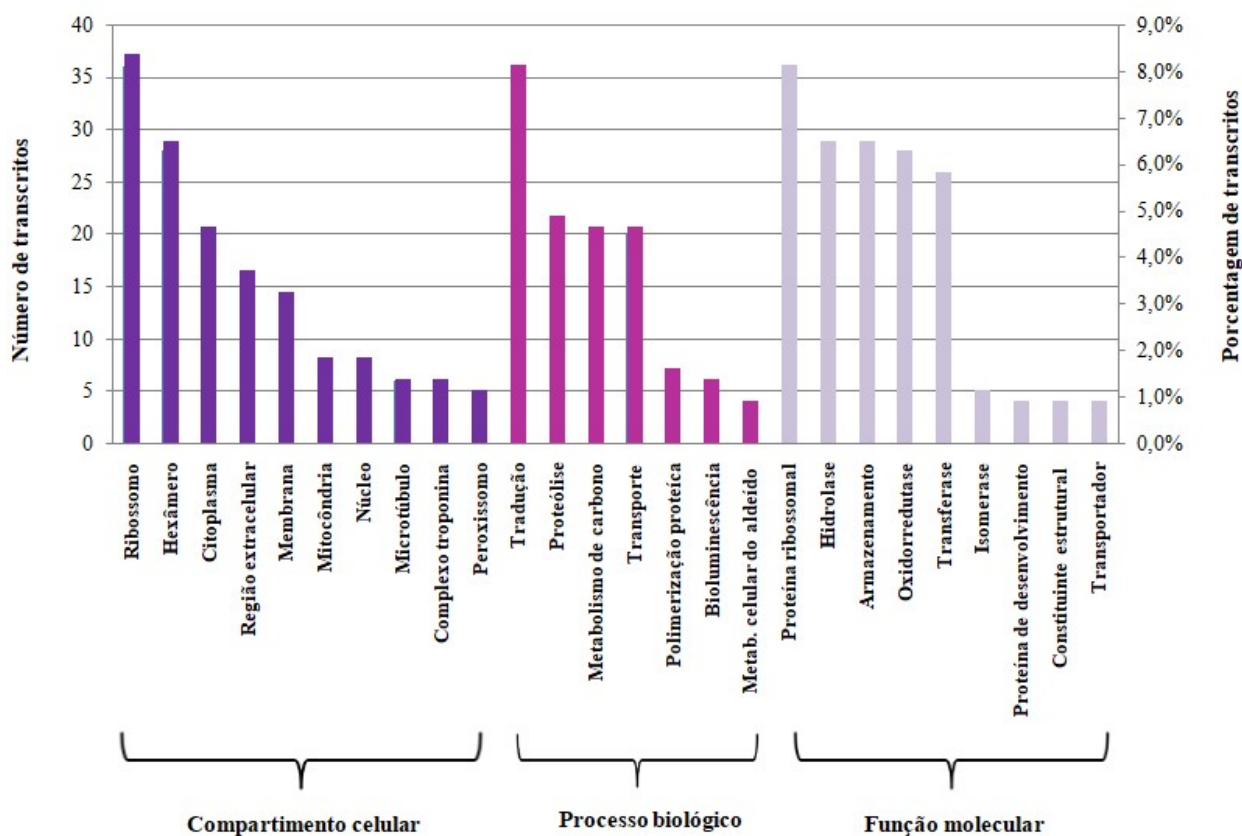


Figura 12: Anotação do GO dos transcritos das lanternas do díptero bioluminescente *A. luminosa*.


```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Hex 292 -----ALVFACACALASCVYTTKNVKVADNDFLVKQKALFEVPHFHQPHVHPNHFEAKNKNMEEHDCYTKPEVVE
Hex 514 ----SITALVFACVFTLASCAYITK---YADNDFLLKQKAVLEVLHHYHQYDIHHEHLEVAKNKNMEENINHYTHPEAVH
Hex ZOP ----MRFLLVALLAGLCAAVSVPNGTGYQAS----RQKEIYRLFYVNPQPSYYPDHEIEIGKSYRFYENKAEYTKPEAVE
LSP 2 Cqui ---MTYRALVGLAALAAGYVVVPEDKITYADKDFLVKQKQLLEVPQHVVHQHEVHTELWEV SKEYKIEEHYDHYTNVEAVK
Hex Aaeg MKAITLVALLAGLVALAAGYVVVPEDKITYADKDFLVKQKQLLEVPQHVVHQHEVHTELWEV SKEYKIEENYDHYTNVEAVK

      90      100     110     120     130     140     150     160
Hex 292 HFMKFFYVFG-VVPQNEIFSVMPKREQAIALFDLFFYARDWDTFYKTMVWTRYHVNEEDMFYAMTVAVIHRKDMAGIVL
Hex 514 KFLEICKYH-MLPKHTVFTIMNKYHREQAVALYDLFFYARDWDTLYKTMVWARYNVNEEDMFVYVMNVAVLHHPMKHIVL
Hex ZOP EFYNYWYYGKALQRGEIFSVFYQEHLEQAIALFKLFFYAN TWETFYKTVWARNNVNEGMVLYSLSVALIHRPDTYYIAL
LSP 2 Cqui EFVEFYKHG-MLPFDEIFSVFHETHREQAIALFHFVYKADWETFYKSVWARFHMNEGMFVYAVTVAMLHRKDMAGLEL
Hex Aaeg EFVKFYKG-MLPFDEIFSVFHYTHREQAIALFHFVYKADWETFYKSVWARFHVNEGMFVYAVTVAMLHRKDLAGLEL

      170     180     190     200     210     220     230     240
Hex 292 PAPYEINPYFFYNSEVIQEAQSHRMQGFYDTKKVEDTYTVIPANTYFNVYVNEESKISYPTEDIGLNSYYHYLYADYP
Hex 514 PPLYEVNPFYFFPSNVIQKALQKMHGFHDVKKVEDTYTVILPANTYFDYTNDEGLSXYTEDVGLNSFYFFYINYP
Hex ZOP PPIYEVYPPYFFYNSEVIQEAQFYKQM--YRQYGAQYNGKTIYANYSFYYLNLHPEQSLSYPTEDVGINSFYFFYNYLYP
LSP 2 Cqui PAPYEIYPPYFFNTEVIQKAQYKMGQFYGMKKIDVYTAIIPNTYFWYVHTNEDQKVSYPTEDIGLNTYFFYFHADYP
Hex Aaeg PAPYEIYPPYFFNTEVVQKASQYKMGQFYGMKKVDDVYTAVIPNTYFWYVHTNVDQKVSYPTEDIGLNTYFFYFHADYP

      250     260     270     280     290     300     310     320
Hex 292 VMNRRKEFGLDKQVGIKILMYKSKAILARYMYERLSNDLGKIPEFSWFAPIKTYGYSDLRYNNGAPPSPRENYKVNRR--
Hex 514 VWMTDSKYGVNPKLRGEQIVSFYNNLLARYMYERLSNDMGIEPEFSWYEPKLTGYYPALSYYNGYHFPSPRENYKLYN--
Hex ZOP YWNGEEFNLYKDRNGELFYMYQQILARYMYERLSNDPGEISVNVWVPEFTGYYPSLTYPGSAQFPVVRPNYAHLYEYF
LSP 2 Cqui FWMGGKEFGLYKDRRGEMLYKHOQLLARYMYERLSNDLVGVIPEFSWYKPIKTYGYPNMHYYNGVSPSRDNLNFVYT--
Hex Aaeg FWMGGKEFGLYKDRRGEMLFKHQQLLARYMYERLSNDLGTIPEFSWYKPLPTGYYPNMHYYNGVSPSRDNNHYVYT--

      330     340     350     360     370     380     390     400
Hex 292 -----EENYKDLTDVLDTERYLRLKIFLQGYIGMPDGHVDITSPFAFNGLGNLVPYDGPFFYANLTTIGNFGLAKK
Hex 514 -----EKTYEHIKVKTSLEAIRDMIKGYLLKSDGTQVDLTKPESISEIGNLAYEHCCDHSYRAALQFGLIKK
Hex ZOP YNYGQYKGSNKYAYSYSYVQDYERRIRDAIDSGYVMTKSGQVVEFLTQEGINTLGNLIEGNPDSPPYQYQYAYQ-VFARH
LSP 2 Cqui -----PENYFBIDEIDYEHRIREVIDQGYVLDPGSHVDLTKPESIEYLGNLIQENPDSVNTRYKYVVG-BIARV
Hex Aaeg -----PENYYDVDELVDYEHRIREVIDQGYLVFPNGSHVDLTDPESEYLGNVLIQENPDSVNTRYKYVVG-QIARI

      410     420     430     440     450     460     470     480
Hex 292 MLGAAVKTFDHAKIIPSVLAHYEISLRDEFTYQYKYILKNYMEYKLPYSYKPE-EIEFKGVKIESVDMDKLVTYFDKF
Hex 514 LLGGSIQTTDKNIIIPSVLAHYETALRDEPAIYQYKYHLYNTHFVYKNRSLPSYTTD-ELSEKGVKIESMEMDKLVTYFDRF
Hex ZOP LLGYSPTPISYHKLYPSALEHFEETSMRDEAFYQLYKKLITPFFKFAQHYKYTERDLVYEGVEVKNVEFDRLVTYFDYY
LSP 2 Cqui LLGASVEHFDDHKVIPGALEHFEETSMRDEAFYQLYKRITHWYWEFKDHLPHYTYD-EINFPGLKIESAEVDKLVTYFDRY
Hex Aaeg LLGASVEHFDDHKVIPSVLEHYEISLRDEAFYQLYKRITHWYWEFKDHLPHYTYD-ELNFAGVKVESVEVDKLVTYFDRS

      490     500     510     520     530     540     550     560
Hex 292 DADITNAVDLG-VAEKTVN-----YYIKARQWRLNHLPFPTKINVVS DKSQKAVVRLPIGPKQASEY
Hex 514 DSDITNAVDLNTHTDKPVD-----FTIKARQWRLNHLPFPTKIYIQSDKAQKAVVRLYMGPKKHYEH
Hex ZOP YADLSSAVYVTEPEEFVQDS-----FKVQAQQRNLHKAFTYKYVYDSQTEAVVVKVFLGP-KYDEY
LSP 2 Cqui DADITNAVDVEVFDEASMKASITKFKGKIAHYQGEDFVIKARQWRLNHMPFTVKLNVMS EKATKGIVRMYLGP-KYDAY
Hex Aaeg DADITNAVDVEVFDETTMK-GSDMKKFKGKIAHYQGEDFVIKARQWRLNHMPFTKLNVVS EKVTKGVVRVYLAP-KYDQY

      570     580     590     600     610     620     630     640
Hex 292 GHVFDVEENRHNFYVLDNWWVDLKEGRNVLTRNCDEFIPFVKDRTPFYELYKNLMLAVKQAKFEIDMTEAHNGFPYRLM
Hex 514 GPGFDLNENCDNYFILDRWVVEKLAGRNVVSRNCDEFSTFVKDRTPYELYKSVMMAIKGEKMFSETPVPYNAPYRLM
Hex ZOP GRYINLTENWMNFVQFDHFVYKLSGQNVITRNSREIYNYMHDRTSYYQGYQKVMGVQE--EQYTTKGNQYVGFPPQRYM
LSP 2 Cqui GHVYGVNENRENFVLLDVFVYDFVVGKNTIVRDSSTKFPVLYQDRTSYFELYKWMVDAYNGVKKFPLDMTEAHCFFSRLM
Hex Aaeg GHVYGVNENRENFYLLDVFVYDFVVGKNTIVRDSSTQSMFVQDRTPYELYKWMVDAYNGVKKFPLDMTEAHCFFPARLM

      650     660     670     680     690     700     710     720
Hex 292 LPKGKKGGMPFQFFVIVSPY TPLVPYATGYDFVISAGIGSGARYIDSYTWGYPLDRKI--DLAHWYTPNMYYHEAMIHF
Hex 514 LPKGKKGGMPFQFYAIVMPY TEPKV-----MPTIETGIGSTATFIDSLSLRPFDRNV--DESHWYTPNMYYHDAMIHF
Hex ZOP LPKGSYGGVPYQFYVFAKTVPYKT-----QKADVPMVGTGSQYVDAYPMGYPFDRPVYWEKVFYITPNAYMYETKVYH
LSP 2 Cqui LPKGKKGGMPFQLYFIVSPY HAPSTPQYEGDYTLNCGVSGSARVDSLPFGYPFDRPI--DEKIWFTPNMYYDTMIYN
Hex Aaeg LPKGKKGGMPFQLYFIVSPY HAPSTPQYEGDYTLNCGVSGSARVDSLPFGYPFDRPI--DEKWFVTPNMYYDAMVFH

      730     740     750     760     770     780
Hex 292 KKQAEINMMSGWIMYITLLQYVLAIRN-----
Hex 514 KKEAEIN-----
Hex ZOP RDSDAVNYSQQEEYRQKQYYPQRDYNTNKYNYSQQYQQQANQQYKQQGQQYKQYGYG
LSP 2 Cqui KNEKEINAVH-----
Hex Aaeg KNEKEINAVH-----

```

Figura 13: Alinhamento das estruturas primárias das hexamerinas de lanternas de *A. luminosa* (Hex 292 e Hex 514), túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *Z. morio* (Hex ZOP), larval serum protein 2 de *C. quinquefasciatus* (LSP 2Cqui) XP001843494.1 e hexamerina de *Aedes aegypti* (HexAaeg) XP001661466.1. Delineados em preto estão os resíduos conservados nas hexamerinas e em vermelho os sítios de reconhecimento para glicosilação. Cores dos resíduos de acordo com suas características físico-químicas: vermelho - polar ácido (D, E); azul escuro - polar básico (K, R); rosa - polar básico não carregado em pH 7,0 (H); laranja - estrutura simples e apolar (G); verde escuro e ciano - hidrofóbicos (I, L, M, V, W, A, Y, F); cinza - estrutura cíclica e rígida (P); azul claro - polar neutro (S, N, Q, T); marrom - cisteína (C).

As relações filogenéticas das sequências dos clones 292 e 514 de *A. luminosa* e hexamerina de *Z. morio*, encontrada no corpo gorduroso e túbulos, foram inferidas utilizando sequências de proteínas classificadas na superfamília das hexamerinas encontradas no GenBank. A análise filogenética considerou a hemocianina de *P. marginata* (Plecoptera) como grupo externo (Fig. 14). As hexamerinas de Coleoptera (*T. castaneum*, *L. decemlineata* e *Z. morio*) formaram grupos com valores de suporte altos, bem como as hexamerinas de Diptera (*C. vicina*, *A. luminosa*, *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*).

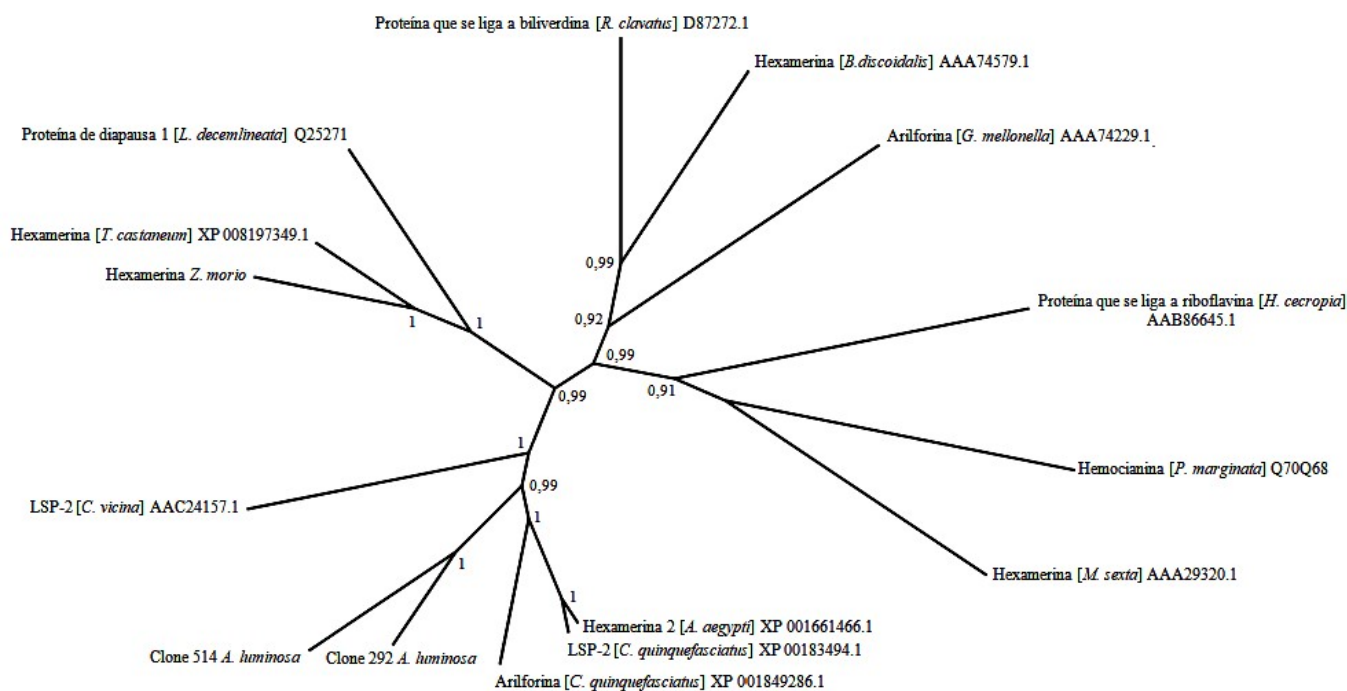


Figura 14: Árvore filogenética das hexamerinas baseada em análise Bayesiana.

5.4. OCORRÊNCIA DE AMP-CoA LIGASES EM TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO DE *Z. morio* E LANTERNAS DE *A. luminosa*

5.4.1. Túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de larvas de *Z. morio*

A análise do transcriptoma dos túbulos de Malpighi de *Zophobas* identificou em torno de 20 transcritos que possuem a inferência de serem 4-cumarato-CoA (4CL) ligases e no corpo gorduroso foram obtidos 13 transcritos similares a essas enzimas. As enzimas 4-cumarato ligases estão relacionadas ao metabolismo fenilpropanóide em vegetais e pertencem à superfamília de AMP-CoA ligases, que inclui enzimas que estão envolvidas em uma grande variedade de vias metabólicas, como oxidação e biossíntese de ácidos graxos (acil-CoA ligases), ativação de aminoácidos (tRNA sintetases não-ribossomais), reação bioluminescente em Coleoptera (luciferases) e metabolismo de xenobióticos (acil-CoA sintetases) (KNIGHTS e DROGEMULLER, 2000; STUIBLE et al., 2000; VIVIANI, 2002; SCHMEIZ e NAISMITH, 2009).

A Tabela 8 mostra a identidade resultante dos alinhamentos das estruturas primárias dos transcritos similares à 4CLs (resíduos de aminoácidos > 400) dos túbulos e do corpo gorduroso com a enzima tipo luciferase anteriormente clonada dos túbulos (VIVIANI et al., 2009) e as abundâncias destes transcritos nos tecidos analisados. A partir destes alinhamentos nota-se que o corpo gorduroso e túbulos possuem AMP-CoA ligases cujas estruturas primárias são diferentes da enzima tipo luciferase anteriormente clonada. Entretanto, no corpo gorduroso um dos transcritos (12994) apresentou 92% de identidade com a enzima tipo luciferase. A abundância destes transcritos foi baixa em ambos os tecidos analisados (Tabela 8).

Os alinhamentos das AMP-CoA ligases obtidas do transcriptoma dos túbulos e corpo gorduroso indicou que *Z. morio* possui várias isoformas deste grupo de proteínas. Além disso, ambos os tecidos possuem uma isoforma com 99% de identidade (transcrito 15990 dos túbulos e 14445 do corpo gorduroso). A identidade de outras ligases dos túbulos com o transcrito 15990 do corpo gorduroso foi de 24-42%.

Tabela 8: Identidade do transcrito similares à AMP-CoA ligases dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *Z. morio* com a enzima tipo luciferase previamente clonada a partir dos túbulos desta espécie, e a abundância (FPKM) destes transcritos nos tecidos analisados.

Túbulos de Malpighi				Corpo gorduroso			
ID do transcrito	FPKM	Nº de resíduos de aminoácidos	Identidade com a enzima tipo luciferase (%)	ID do transcrito	FPKM	Nº de resíduos de aminoácidos	Identidade com a enzima tipo luciferase (%)
17151	3,74	500	25	12994	3,66	523	92
12540	6,69	430	49	14445	32,65	529	50
17299	9,22	486	37	13996	43,46	528	26
18831	24,26	471	52	7728	4,06	555	22
18957	46,65	570	38	15990	13,69	581	23
18889	14,68	529	55	15351	4,41	406	21
19517	19,57	555	26				
20374	13,74	551	28				
20839	7,20	474	52				
20890	77,1	574	29				
20938	3,75	425	29				
21052	11,14	425	29				

Foi possível amplificar com *primers* específicos uma sequência parcial (~ 600 pb) de um transcrito similar à uma CoA ligase dos túbulos de Malpighi (Fig. 15), entretanto, para visualização do amplificado a reação foi reamplificada, corroborando com nossos dados do transcriptoma que indicam baixa abundância de ligases neste tecido. A baixa abundância dessas enzimas pode explicar a ausência de ligases em nosso estudo anterior usando transcritos de biblioteca de cDNA dos túbulos de *Z. morio* (SILVA et al., 2015a), embora uma enzima tipo luciferase já tenha sido clonada a partir deste órgão (VIVIANI et al., 2009). A ausência de amplificação com *primers* específicos no corpo gorduroso pode ser devido à baixa abundância destes transcritos.

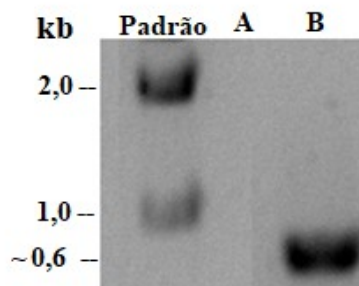


Figura 15: Gel de agarose 1% da amplificação de um transcrito similar à AMP-CoA ligase dos túbulos de Malpighi de larvas de *Z. morio*. A. Ausência de amplificação na 1ª reação. B. Gene amplificado na 2ª reação de amplificação.

5.4.2. Lanternas de *A.luminosa*

Na análise das lanternas do díptero *A. luminosa* obteve-se cerca de 1% de sequências que possuem similaridade com luciferases de Coleoptera, sendo portanto AMP-CoA ligases, apesar da distância filogenética destas ordens. Essas sequências são iguais entre si e exibem 44% de identidade com luciferase de *Brasilocerus* sp. (ACT685961), 45% com luciferase de *Phrixothrix hirtus* (AAD345432) e 44% com luciferase de *Taximastinocerus* sp. (ADK564781), todas espécies de Phengodidae. Estes clones sequenciados possuem sequências parciais e são idênticos entre si, sendo iguais a sequência de uma enzima tipo luciferase clonada anteriormente por Prof. Dr. Vadim Viviani que foi predita ser a luciferase desta espécie (comunicação pessoal).

Foi realizada a análise filogenética das 4CLs de *Z. morio* usando sequências de AMP-CoA ligases disponíveis no GenBank e a possível luciferase de *A. luminosa* para tentar elucidar a relação das ligases obtidas em nossa análise com outras enzimas dessa família (Fig. 16). Foi identificado um grupo que é fortemente suportado pelas luciferases de vagalumes, bem como um outro grupo formado por enzimas tipo luciferases de Coleoptera e Diptera. A enzima tipo luciferase de *A. luminosa* é mais próxima das luciferases de vagalumes do que com as AMP-CoA ligases encontradas nos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *Z. morio*, exibindo em torno de 25% de identidade com essas enzimas. As ligases de *Z. morio* são mais próximas de enzimas 4CLs de *T. castaneum* e *B. mori* e AMP-CoA ligase de *C. quinquefasciatus*.

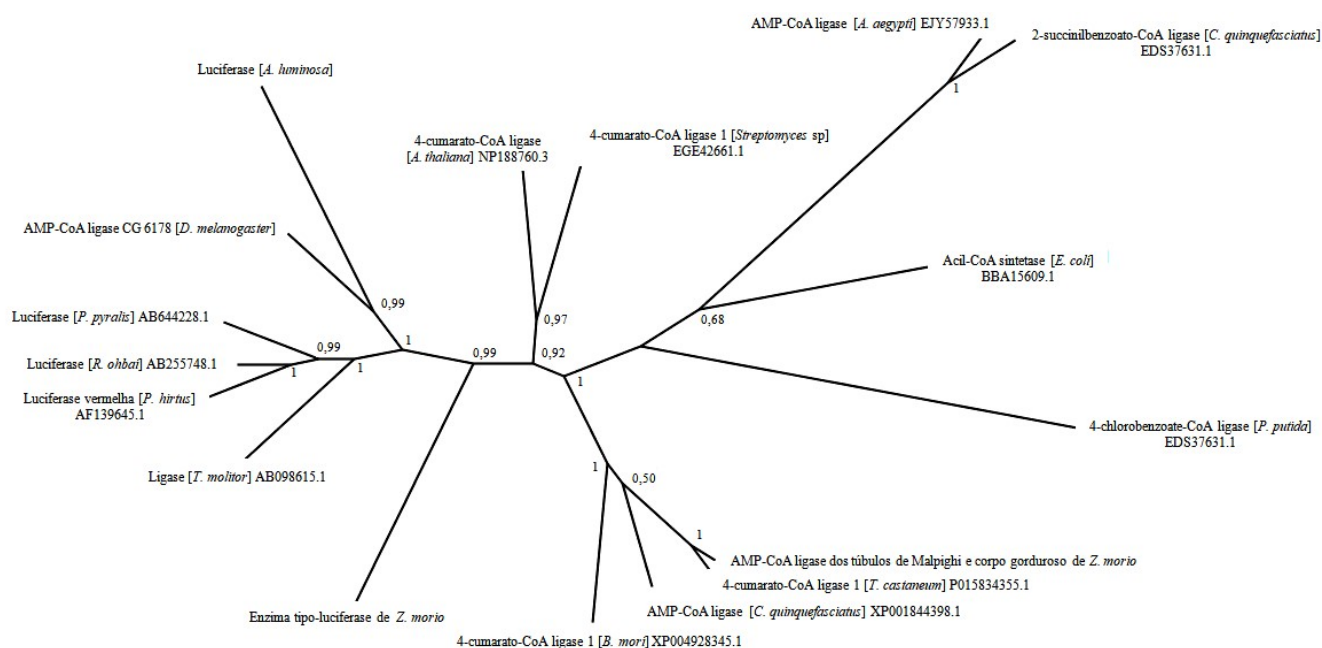


Figura 16: Árvore filogenética das AMP-CoA ligases baseada em análise Bayesiana.

5.4.3. Multialinhamento de CoA-ligases e análise de módulos funcionais

Como esperado, as ligases de ambos os tecidos apresentam os módulos I (SSGSTGLPKG), II (GYGLTE) e III (LHSGD) que estão envolvidos na ligação de ATP e são particularmente conservados na superfamília das AMP-CoA ligases (Fig. 17). Esses módulos estariam envolvidos com a função de ligação ao ATP e adenilação (VIVIANI, 2002). As ligases dos túbulos e corpo gorduroso apresentam o módulo I 227SSGTTGLPKG236; em relação ao módulo II houveram substituições, 377GYGLTE383 (GYGMSE/GYGQTE); e o módulo III 460LRTGD464. O motivo GEICIRG é conservado em 4CLs e sugere-se que esteja envolvido na estabilização da estrutura proteica (STUIBLE et al., 2000), ligases de *Z. morio* apresentaram esse motivo 430GELLVK436.

Além dos módulos I, II e III envolvidos com a ligação do substrato comum e o ATP, as ligases também apresentam módulos para a ligação específica do substrato carboxílico. As enzimas 4CLs ativam derivados de ácido cinâmico, usualmente ácido cúmarico, ácido caféico e ácido ferúlico, entretanto, as isoformas exibem especificidade diferentes para esses substratos (STUIBLE et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2003). Para a isoforma At4CL2 foi proposta uma assinatura de 12 aminoácidos, chamada de

substrate binding pocket (SBP), para explicar a especificidade dessa enzima ao ácido caféico. Nesta isoforma o SBP é constituído pelos seguintes resíduos de aminoácidos: I252, Y253, N256, M293, K320, G322, A323, G346, G348, P354, V355 e L356. O modelo também demonstra que a acessibilidade do SBP aos derivados de ácido cinâmico monometoxilado ou dimetoxilado é controlada principalmente por exclusão por tamanho destes compostos e a ativação do ácido cinâmico é mediada pela hidrofobicidade global do SBP (SCHNEIDER et al., 2003). As ligases de *Z. morio* apresentaram algumas substituições nesta assinatura de 12 aminoácidos do SBP proposto para At4CL2 (Fig. 16).

As luciferases de besouros possuem na porção C-terminal o tripeptídeo sinal SKL, que as dirige para os peroxissomos (VIVIANI, 2002). A enzima tipo luciferase previamente encontrada nos túbulos possui sequência de endereçamento SARI para retículo endoplasmático (Viviani et al., 2009). Nossa análise indicou que nenhum transcrito de ambos os tecidos possui a sequência de endereçamento SARI. Nos túbulos de Malpighi apenas um transcrito (20689) possui SKL (endereçamento para o peroxissomo) no final da sequência, esse transcrito possui 45% de identidade com a luciferase de *Photinus pyralis* (AB644228.1) e 36% com a enzima tipo luciferase clonada de *Z. morio*. Ressalta-se que como os transcritos possuem tamanhos variáveis não é possível prever a sequência peptídica final de todos eles.

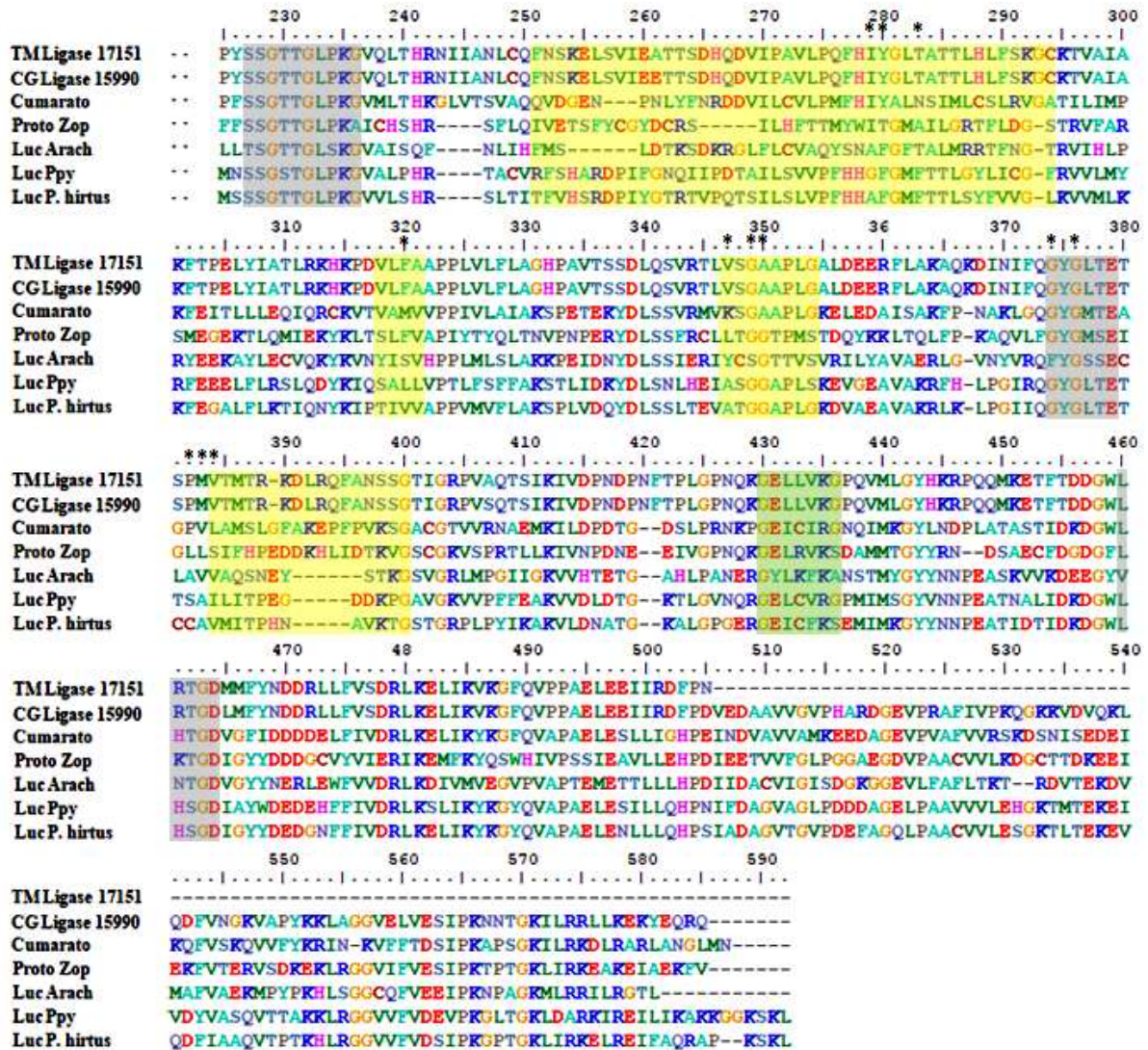


Figura 17: Comparação dos motivos conservados nas enzimas AMP-CoA ligases: ligase dos túbulos de Malpighi (MT Ligase 17151) e corpo gorduroso (FB Ligase 15990) de *Z. morio*, 4-cumarate-CoA ligase 2 de *Arabidopsis thaliana* OAP07084.1(coumarate), enzima tipo luciferase previamente clonada desta espécie (Proto Zop), luciferase *A. luminosa* (Luc Arach), luciferase de *P. pyralis* AB644228.1 (Luc Ppy) e luciferase de *P. hirtus* FJ54529.1 (Luc P. hirtus). Sombreados em cinza estão os módulos conservados nas AMP-CoA ligases relacionados com a ligação ao ATP e adenilação, em amarelo o sítio de ligação da luciferina nas luciferases e em verde o motivo conservado em 4CLs. Resíduos que compõem o SBP em At4CL2 são marcados com um *.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho realizamos a comparação dos transcriptomas dos túbulos de Malpighi e do corpo gorduroso de larvas de *Zophobas morio*, um besouro tenebrionídeo muito utilizado comercialmente, para melhor compreender a fisiologia molecular destes tecidos em coleópteros. Comparamos também as lanternas do díptero bioluminescente *Arachnocampa luminosa*, que derivam dos túbulos de Malpighi, com os túbulos de *Z.morio* para melhor entender a diversificação funcional dos túbulos a nível molecular nos insetos, especialmente a origem da bioluminescência em Diptera.

6.1. TÚBULOS DE MALPIGHI

A maior parte das informações sobre os mecanismos e fisiologia dos túbulos de Malpighi é proveniente de estudos com *D. melanogaster* e este conhecimento é inferido para os túbulos dos insetos em geral (DOW et al., 1994; WANG et al., 2004, DOW e DAVIES, 2001; DOW e DAVIES, 2006; DOW, 2009; BEYENBACH et al., 2010). Nossa análise trouxe informações importantes sobre os túbulos de uma larva de Coleoptera muito utilizada comercialmente, especialmente em tenebrionídeos, e sua diversificação anatômica e funcional em insetos em geral.

Análises do transcriptoma de túbulos já foram realizadas em muitas espécies, incluindo os dípteros *D. melanogaster* (WANG et al., 2004), *Anopheles gambiae* (OVEREND et al., 2015), *Aedes albopictus* (ESQUIVEL et al., 2016) e o coleóptero tenebrionídeo *Tribolium castaneum*, entretanto, neste último estudo as bibliotecas incluíram túbulos e intestino posterior (PARK et al., 2008).

Anteriormente realizamos uma análise preliminar do perfil dos transcritos dos túbulos das larvas de *Z. morio* baseado numa biblioteca de cDNA (SILVA et al., 2015a). Na comparação desta análise com a anteriormente realizada, percebeu-se que mesmo com o número limitado de sequencias pudemos encontrar genes tipicamente expressos nos túbulos, como aqueles relacionados com excreção, detoxificação e transportadores. Entretanto, o sequenciamento de nova geração do transcriptoma forneceu uma quantidade maior de dados onde pudemos realizar um estudo mais amplo deste tecido.

Nesta análise também encontramos vários transcritos que possuem similaridade com AMP-CoA ligases, enzimas que em nosso estudo anterior não foram encontradas

devido ao número limitado de sequências analisadas, apesar do fato de uma enzima tipo luciferase ter sido clonada pelo nosso grupo a partir deste órgão (VIVIANI et al., 2009). A existência da enzima tipo luciferase nos túbulos de Malpighi de *Z. morio* pode servir como modelo para entender a origem evolutiva da bioluminescência em Coleoptera e possivelmente em Diptera, pois as lanternas de *Arachnocampa* derivam dos túbulos.

Os produtos gênicos mais abundantes nos túbulos de *Drosophila* são transportadores, proteínas ribossomais, peptidases, V-ATPase, ATP-sintase, produtos gênicos envolvidos em vias sinalizadoras, álcool desidrogenase, glutatona transferase, citocromos P450, entre outros (WANG et al., 2004). Na análise dos túbulos de *B. mori* (Lepidoptera) foram identificados genes de vários transportadores, como de cátions orgânicos, monocarboxilatos e açúcares, e genes de enzimas que participam no metabolismo e detoxificação, como os citocromos P450 e álcool desidrogenase (XIA et al., 2007). Nossos resultados estão de acordo com esses estudos e os transcritos citados e suas funções serão discutidos a seguir. As funções dos túbulos na imunidade, metabolismo de compostos tóxicos, metabolismo de nitrogênio e biossíntese de pigmentos oculares serão discutidas juntamente com os dados obtidos do corpo gorduroso na seção 6.3.

6.1.1. Junções celulares dos túbulos de Malpighi

Similar aos túbulos de *Drosophila*, os túbulos de *T. castaneum*, espécie filogeneticamente próxima e de hábitos parecidos ao *Z. morio*, possuem dois tipos celulares, células principais e estreladas (Fig.18) (BEYENBACH et al., 2010; KING e DENHOLM, 2014). Nos túbulos de Malpighi, as moléculas e íons podem se movimentar de forma transcelular, transporte através do epitélio via interior da célula, e paracelular, transporte entre células epiteliais controlado por junções celulares (BEYENBACH et al., 2010; IZUMI e FURUSE, 2015).

Em invertebrados, o transporte paracelular em tecidos epiteliais envolve junções septadas. Os septos bloqueiam o movimento extracelular de compostos/moléculas e desta forma atribuem ao epitélio a propriedade de selecionar a troca entre a superfície e cavidade, no caso o lúmen do túbulo (BIOLOGIA CELULAR ATLAS, 2016).

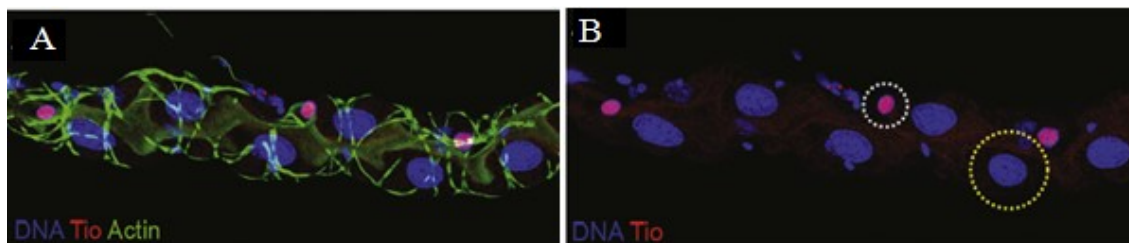


Figura 18: Células principais e estreladas dos túbulos de Malpighi de *Tribolium castaneum*. A e B: Porção dos túbulos de um indivíduo adulto marcado para DNA (azul), fator de transcrição *Tiptop* (vermelho que sobreposto parece rosa escuro) e actina (verde). Em B, a célula estrelada está circulado em branco e as célula principal circulado em amarelo. Fonte: KING e DENHOLM, 2014.

Junções septadas possuem várias proteínas associadas, incluindo proteínas transmembranas e citoplasmáticas (IZUMI e FURUSE, 2015). Os túbulos de Malpighi de larvas de *Zophobas* possuem as seguintes proteínas que são relacionadas com a presença de junções septadas: *neuroglian*, *neurexin IV*, *contactin*, *lachesin*, *fasciclin II* e III.

O transporte paracelular em tecidos epiteliais também envolve junções de aderência, além das junções septadas (BEYENBACH et al., 2010). Junções aderentes atuam na ancoragem entre as membranas das células adjacentes e ancoragem do citoesqueleto, onde este é constituído de microfilamentos de actina (BIOLOGIA CELULAR ATLAS, 2016). As proteínas *armadillo* e α -*catenin* são associadas à essa junção (BEYENBACH et al., 2010) e também foram encontradas em nossa análise dos túbulos.

A presença de junção comunicante (GAP) nos túbulos sugere que esta junção tenha um importante papel na comunicação entre as células e diurese. Junções comunicantes são canais que mediam a comunicação direta entre células vizinhas e em insetos são constituídas por inexas, tais junções podem servir como importantes alvos para o desenvolvimento de inseticidas. As proteínas inexas estão relacionadas na embriogênese em insetos e em insetos adultos são importantes para a comunicação neuromuscular e na função renal (CALKINS e PIERMARINI, 2015). Os túbulos de *Zophobas* apresentam transcritos similares a inexas 1, 2, 3 e 7.

6.1.2. Maquinaria de transporte de íons e água para formação de urina

A maior parte do epitélio dos vertebrados utiliza Na/K ATPase para energizar o transporte transepitelial, os túbulos, entretanto, utilizam a V-tipo H⁺ ATPase para a

secreção transepitelial de eletrólitos e solutos orgânicos por meio do bombeamento de íons de hidrogênio para o lúmen (CHAPMAN, 1998; BEYENBACH et al., 2010). A V-tipo H^+ ATPase está localizada na membrana apical das células principais e os íons H^+ são bombeados através da membrana apical sem um íon de carga oposta acompanhando, gerando um gradiente elétrico. O potencial eletroquímico gerado pela bomba de próton pode dirigir o transporte do citoplasma para o lúmen do túbulos de Na^+ , K^+ , Cl^- ; este último segue via paracelular e/ou pela membrana apical das células estreladas (BEYENBACH et al., 2010). A importância da V-ATPase na função tubular é reportada para várias espécies além da *Drosophila* (WESSING et al., 1993), bem como em *T. molitor* (WIEHART et al., 2003) e *Rhodnius* (GUTIERREZ et al., 2004).

A Fig. 10 mostra as subunidades de V-ATPases encontradas em nossa análise dos túbulos de *Z. morio*. Outros transportadores de íons obtidos nos túbulos de *Z. morio* foram: ATPase Na^+/K^+ subunidades α , β 1 e 2 (bomba de Na^+/K^+); NH_3 (transporte acoplado de Na^+); NKCC (transporte ativo de $Na^+/K^+/Cl^-$); Kir 2 (canal de K^+); CIC2 x1 e x2 (canal de Cl^-); e KCC (transportador de K^+/Cl^-) (BEYENBACH et al., 2010; JUEL, 2016; LI et al., 2017).

Em sistemas biológicos a conversão de CO_2 e H_2O em ácido carbônico é catalisada pela enzima anidrase carbônica. Presume-se que nos túbulos a presença dessa enzima esteja relacionada com o fornecimento de H^+ para a V-ATPase, atuando como uma abundante fonte de prótons. A associação da presença de anidrase carbônica e V-ATPase também pode ser estendida para os vertebrados, pois as células intercaladas do ducto coletor possuem V-ATPases e anidrase carbônica II (DOW e DAVIES, 2001).

As células estreladas dos túbulos de Diptera secretam Cl^- da hemolinfa para o lúmen. Junções comunicantes conectam as células estreladas e principais, dessa forma a voltagem na membrana apical seria similar em ambos os tipos celulares e permitiria o transporte de Cl^- do citoplasma da célula estrelada para o lúmen por meio de canais de Cl^- (WENG et al., 2008; BEYENBACH et al., 2010). Tais mecanismos de transporte indicam que há uma separação especial no transporte de moléculas carregadas, cátions são transportados via células principais e Cl^- (ânion) por meio das células estreladas (DOW e DAVIES, 2001).

Nos túbulos, a água pode se movimentar de forma paracelular e transcelular, esta última é realizada pelos canais de água aquaporina (AQP), proteína encontrada em todos os grupos de animais (CAMPBELL et al., 2008; BEYENBACH et al., 2010).

Algumas aquaporinas são exclusivamente permeáveis à água, mas algumas permitem a passagem de glicerol, uréia, NH₃, NO, CO₂ e íons. Aquaporinas já foram caracterizadas em vários tecidos de insetos, como corpo gorduroso, traquéia, intestino e túbulos de Malpighi (*Drosophila*, *Rhodnius* e *Acheta*), todas com função de transporte de água (CAMPBELL et al., 2008; BEYENBACH et al., 2010). Entretanto, em *Drosophila* foi encontrada uma aquaporina que transporta cátions monovalentes (YANOCHKO e YOOL, 2002). Os túbulos de *Z. morio* possuem aquaporinas similares à AQP_{cic}, AQP_{Ang.G} e NIP1-2, sendo esta última permeável ao glicerol em *Arabidopsis* (WEIG e JAKOB, 2000).

6.1.3. Transporte de solutos orgânicos e inorgânicos

Os túbulos de Malpighi de *Drosophila* apresentam uma ampla gama de transportadores de solutos orgânicos e inorgânicos, como ácidos monocarboxílicos, aminoácidos e multivitaminas. A diversidade de transportadores nos túbulos mostrou que os túbulos possuem importante papel na excreção de compostos além de sua função clássica na osmorregulação. A existência de tantos transportadores nos túbulos torna desnecessário suscitar o transporte paracelular de tais compostos e essa premissa pode ser atribuída aos insetos em geral (WANG et al., 2004, DOW e DAVIES, 2006). A Fig. 11 mostra alguns dos transportadores encontrados nos transcritos dos túbulos *Zophobas*.

Transportadores ABC (*ATP binding cassette*) compreendem uma das maiores famílias de proteínas parálogas e estão presentes em todos os organismos. O transporte mediado por elas requerem a hidrólise de ATP para transportar os substratos através da membrana lipídica. Essas proteínas transportadoras são, em geral, relativamente específicas para o seu substrato e existem transportadores ABC para vários tipos de moléculas, como pequenas, grandes, altamente carregadas e sistemas com moléculas altamente hidrofóbicas que são específicos para íons orgânicos, açúcares, aminoácidos, proteínas e polissacarídeos (HIGGINS, 2001; DERMAUW e LEEUWEN, 2014).

Os túbulos de Malpighi de *Z. morio* apresentam os seguintes transcritos similares à transportadores ABC: subfamília G (ABCG 14; ABCG 20; proteína *scarlet*; proteína *white*), subfamília ABCF4 e transportador ABC de cobre. A subfamília ABCF possui um papel fundamental essencial na regulação da tradução. Em relação à subfamília G, a proteína *scarlet* transporta um precursor de pigmento do olho e aminas biogênicas; e a

proteína *white*, melhor transportador ABC de inseto caracterizado, transporta precursores de pigmentos oculares, de GMP cíclico, aminas biogênicas e capta ácido úrico (DERMAUW e LEEUWEN, 2014).

6.1.4. Canais de cálcio e transportadores

A excreção de cálcio em insetos envolve sua captação e eliminação na forma solúvel. Nos túbulos de Malpighi ocorre o armazenamento de concreções de Ca^{2+} o que torna este órgão o principal local de armazenamento e *turnover* de cálcio. Os túbulos de *Drosophila* possuem a maior parte de Ca^{2+} comparando-se com o resto do corpo e este conteúdo pode aumentar de acordo com a dieta, deste modo, os túbulos atuam no equilíbrio de cálcio por dois mecanismos: excreção de Ca^{2+} no fluido secretado e pelo armazenamento na forma grânulos nas células dos túbulos. A maior parte do cálcio que entra no túbulo, possivelmente por canais de cálcio, é captado e permanece na célula, a outra parte é secretada por meio de uma Ca^{2+} -ATPase para o lúmen numa forma solúvel (DUBE et al., 2000; DOW e DAVIES, 2001).

O cálcio pode atuar em um mecanismo de sinalização dentro das células principais. Um neuropeptídeo se liga a um receptor na membrana e desencadeia sinais que levam à formação de inositol-1,4,5-trifosfato que atua em seu receptor no retículo endoplasmático e libera o Ca^{2+} para o citoplasma e sua saída da célula. O cálcio atua na óxido nítrico sintetase para formação de óxido nítrico que gera GMP cíclico que (indiretamente) estimula a V-ATPase da membrana plasmática apical (DOW e DAVIES, 2001). O transcriptoma dos túbulos de Malpighi de *Z. morio* indicou a presença de transcritos envolvidos na captação e transporte de cálcio, como canal de cálcio, *calcium proton exchanger* e *calcium uptake protein*.

6.1.5. Captação de metais

Íons de metais são essenciais para vários processos biológicos, como respiração e transcrição. Cobre, zinco e ferro são metais essenciais, mas a super acumulação destes e de metais tóxicos, como cádmio e mercúrio, é prejudicial ao organismo. Insetos necessitam de mecanismos para a manutenção da homeostase de metais para prevenir o estresse causado por estes compostos, tais mecanismos envolvem a captação,

distribuição, detoxificação e eliminação de íons metais (YEPISKOPOSYAN et al., 2006).

Sais insolúveis contendo cálcio, magnésio, cobre, cádmio e zinco podem ser encontrados nos túbulos e são armazenados para uso subsequente ou excreção (BRADLEY, 2009). Os túbulos de Malpighi atuam na captação e armazenamento de ferro, a ferritina (*iron binding protein*) já foi identificada nos túbulos de várias espécies, como *Manduca sexta*, *D. melanogaster* e *Rhodnius prolixus* (NICHOL e LOCKE, 1989), e em *Z. morio* alguns transcritos possuem a inferência de serem ferritina. Essa proteína participa na detoxificação, armazenamento e transporte de ferro, mas também pode se ligar a outros metais (LOCKE e NICHOL, 1992; YEPISKOPOSYAN et al., 2006).

Os túbulos de *Z. morio* possuem transcritos similares ao transportador ATPase tipo P que controla a saída de cobre da célula, proteína Cuc da homeostase de cobre, transportador ABC de cobre, tais transcritos envolvidos no metabolismo de cobre. Em relação ao zinco, os túbulos de *Zophobas* apresentam proteínas da família ZIP (1; 2; 7; 9; 11; 13; *fear of intimacy* - foi) que mediam o transporte de zinco por meio da captação do metal para o citoplasma.

6.2. CORPO GORDUROSO

Já foram realizadas algumas análises do transcriptoma do corpo gorduroso de insetos, como em *Glossina morsitans morsitans* (ATTARDO et al., 2006), *Camponotus floridanus* (GUPTA et al., 2015), *D. melanogaster* (JIANG et al., 2005), *B. mori* (CHENG et al., 2006), *A. aegypti* (PRICE et al., 2013), *Melipona scutellaris* (SOUSA et al., 2013), *Bemisia tabaci* (WANG et al., 2010) e do coleóptero *T. castaneum* (Tenebrionidae); onde foi utilizado corpo gorduroso juntamente com uma camada de epiderme de adultos (PARK et al., 2008); e mais recentemente dos coleópteros bioluminescentes da superfamília Elateroidea *P. hirtus*, Phengodidae, (AMARAL et al., 2017a) e larvas de *Aspisoma lineatum*, Lampyridae, (AMARAL et al., 2017b). Nossa análise mostrou a presença de produtos similares as análises de transcriptoma deste tecido de outros insetos, incluindo a presença de transcritos relacionados à imunidade, armazenamento e utilização de nutrientes para geração de energia, detoxificação,

metabolismo do nitrogênio e proteínas sintetizadas neste tecido e secretadas para a hemolinfa.

Na análise realizada no bicho da seda (*B. mori*), um conjunto de genes parece ser expresso especificamente no corpo gorduroso no estágio larval quando comparado com este tecido da pupa (CHENG et al., 2006), entre os quais foram observados em nosso estudo: hexamerinas, lisozima, atacina (peptídeo imune), SPARC (proteína de matriz extracelular), transferrina, catalase, colágeno cadeia alfa 1 e 2, glutatona transferase, S-adenosilmetionina sintase, fator de alongação 1 gama e proteína quimiossensorial.

O corpo gorduroso é o principal local da síntese de proteínas como: hexamerinas, lipoforinas, proteínas envolvidas com o sistema imune, vitelogeninas, transferrinas, cromoproteínas, proteína de ligação ao hormônio juvenil e esterase do hormônio juvenil (CHAPMAN, 1998; PRAKASH, 2008; ARRESE e SOULAGES, 2010). Obtivemos em nosso estudo as proteínas citadas e os transcritos mais abundantes no corpo gorduroso foram proteínas ou precursores sintetizados neste tecido: hexamerinas, precursor da proteína de estresse hídrico de 28 kDa (dsp28), apolipoporfina- III e precursor da proteína de hemolinfa de 12 kDa (Tabela 8).

6.2.1. Junções celulares do corpo gorduroso

As junções celulares entre as células do corpo gorduroso são desmossomos, hemidesmossomos e GAP (PRAKASH, 2008). Junções desmossomos e hemidesmossomos atuam como pontos de ancoragem para adesão célula-célula e célula-substrato. Moléculas transmembranas do desmossomo pertencem à famílias de caderinas e as do hemidesmossomo incluem a classe de integrinas dos receptores de matriz celular (GREEN e JONES, 1996). O corpo gorduroso de *Z. morio* possui transcritos de caderinas 1 e 23 (desmossomos), e isoformas de integrina alfa e beta (hemidesmossomos).

De forma similar aos túbulos de Malpighi o corpo gorduroso mostrou a presença de inxina 1, 2, 3 e 7, que estão relacionadas às junções GAP.

6.2.2. Transportadores de membrana no corpo gorduroso

Uma vez que o corpo gorduroso apresenta um papel chave no metabolismo em insetos, o transporte eficiente através da membrana celular é extremamente importante

para a homeostase. Uma variedade de transportadores de membrana foi identificada na análise do transcriptoma deste tecido em *A. aegypti*. Sugere-se que transportadores e canais de íons do corpo gorduroso sejam utilizados como alvos para o desenvolvimento de novos inseticidas (PRICE et al., 2013).

Nossa análise indicou a presença de transportadores de membrana das seguintes moléculas: açúcares, aminoácidos, sulfato, oligopeptídeo, ácido siálico, transportadores ABC famílias G e E, e aquaporina AQPcic. Em *P. vanderplanki*, a aquaporina PvAQP2 é expressa somente no corpo gorduroso e sua expressão é inibida em situação de extrema dissecação (criptobiose). A provável função da PvAQP2 seria manter a homeostase da água no corpo gorduroso durante condições normais, sendo que em períodos de latência não seria necessária (CAMPBELL et al., 2008).

6.2.3. Armazenamento e utilização de nutrientes

O corpo gorduroso está principalmente relacionado ao armazenamento de nutrientes para geração de energia por meio do metabolismo de carboidratos e lipídeos em insetos (CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007).

6.2.3.1. Metabolismo de carboidratos

Em insetos os carboidratos são armazenados na forma de glicogênio e trealose (dissacarídeo) quando a ingestão destes é maior que o requerido pelo organismo. Ambos podem ser facilmente convertidos à glicose quando as reservas são mobilizadas. Glicogênio é sintetizado a partir de UDP-glicose e pode ser armazenado no interior das células nos músculos de vôo, corpo gorduroso e em volta do tubo digestivo. O glicogênio armazenado no corpo gorduroso é mobilizado pela atividade da glicogênio fosforilase e então convertido à glicose-1-fosfato que é convertida após algumas reações em trealose que é liberada na hemolinfa (KLOWDEN, 2007). Enzimas envolvidas na síntese e mobilização do glicogênio encontradas em nossa análise do corpo gorduroso são mostradas na Fig.19.

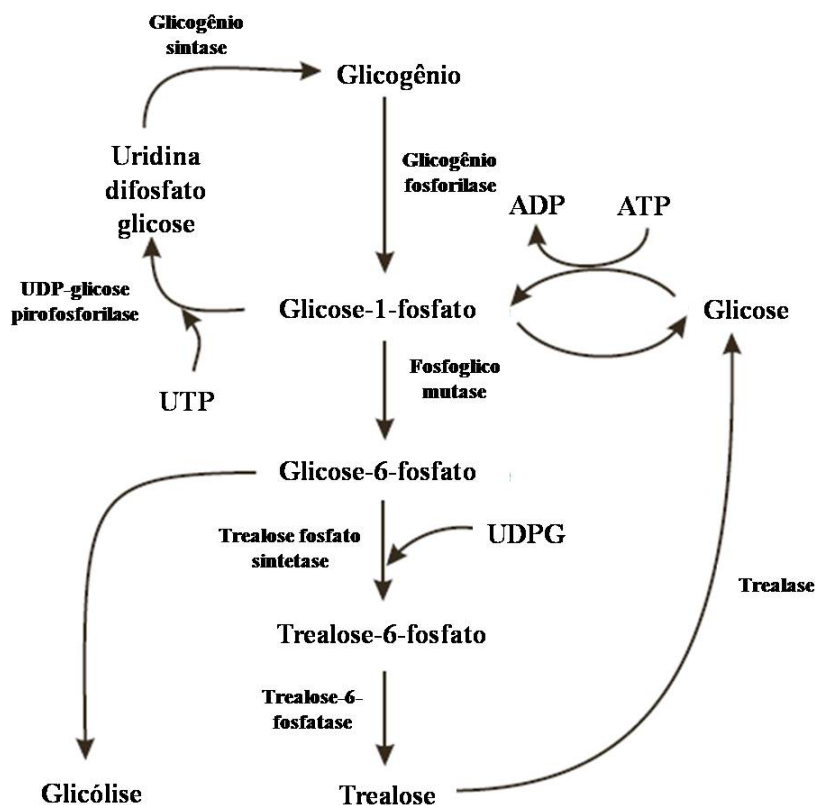


Figura 19: Interconversões de glicogênio, glicose e trealose. O glicogênio é a forma de armazenamento dos carboidratos e é convertido em glicose e trealose quando energia é requerida. Adaptado de: KLOWDEN, 2007.

Trealose é um dissacarídeo não redutor da glicose e o principal açúcar encontrado na hemolinfa de insetos. Após a trealose ser convertida em glicose, esta segue para o primeiro passo da oxidação de carboidratos, a glicólise. Os passos básicos da glicólise e as enzimas envolvidas em insetos são similares à outros organismos (KLOWDEN, 2007). A secreção de trealose pelo corpo gorduroso envolve um transportador chamado de *Tret1*, que determina a distribuição deste açúcar para outros tecidos por meio da hemolinfa (KIKAWADA et al., 2007). Os túbulos de Malpighi além de participarem da excreção, também possuem a capacidade de reabsorver do lúmen moléculas úteis ao organismo, como açúcares e aminoácidos. A trealose pode entrar nos túbulos por meio de transporte passivo, entretanto, as células principais reabsorvem esse açúcar do lúmen provavelmente por meio de um transportador análogo ao *Tret1* (KIKUTA et al., 2012). Em nossa análise de ambos os tecidos de larvas de *Z. morio* foram obtidas sequencias que são similares ao transportador de trealose *Tret1*.

6.2.3.2. Metabolismo de lipídeos

A maior parte dos lipídeos presentes na hemolinfa está associada à uma partícula lipoprotéica, a lipoforina, que é o nome comum utilizado para as lipoproteínas de insetos. Lipoforinas são constituídas de uma superfície fosfolipídica protéica e um núcleo lipídico, o lipídio usualmente transportado é o diacilglicerol (CANAVOSO et al., 2001).

Apolipoproteínas de insetos são sintetizadas pelo corpo gorduroso e junto com o lipídeo a ser transportado são empacotadas para formar a partícula lipoprotéica solúvel. Lipoforinas possuem a capacidade de transportar distintos lipídeos para específicos tecidos, como por exemplo, carotenóides para a cutícula ou glândulas de seda (CANAVOSO et al., 2001).

A maior parte dos lipídeos armazenados no corpo gorduroso são os ácidos graxos provenientes da dieta, eles são sintetizados no intestino e são carregados até o corpo gorduroso pelas lipoforinas durante períodos de alimentação. Lipídeos para armazenamento também são provenientes da síntese *de novo* a partir de carboidratos no corpo gorduroso (CANAVOSO et al., 2001).

A síntese de triglicerídeos no corpo gorduroso é similar à que ocorre nos tecidos de mamíferos. A formação do triglicerídeo é acompanhada da esterificação do diglicerídeo por meio da catálise da diacilglicerol aciltransferase (ARRESE e SOULAGENS, 2010).

A gota lipídica é constituída de um núcleo de lipídios (triglicerídeos e ésteres de colesterol) cercado por uma monocamada de fosfolipídio e colesterol em que proteínas específicas são associadas ou incorporadas. Essas proteínas associadas fazem parte da família PAT, proteínas evolutivamente conservadas, e em insetos ocorre a síntese de duas proteínas dessa família, Lsd1 e 2 (*lipid storage droplet*). Lsd1 está envolvida com a ativação da lipólise e Lsd2 está relacionada com a estimulação da acumulação de lipídeos. Além dessas duas proteínas, existem outras na gota lipídica que podem ter funções na regulação da acumulação de triglicerídeos e sua hidrólise (ARRESE e SOULAGES, 2010). Como esperado, nossa análise encontrou transcrito similar a lsd1 no corpo gorduroso de *Z. morio*.

Os ácidos graxos armazenados nas gotas lipídicas são mobilizados para vários objetivos, como: gerar energia para os músculos de vôo, na forma de trealose ou prolina; fornecimento de lipídeos para os ovários e manutenção da atividade metabólica de outros

tecidos (ARRESE e SOULAGENS, 2010). No caso das larvas estudadas, provavelmente a mobilização tinha como propósito o fornecimento de energia para o indivíduo, uma vez que as larvas não estão em fase reprodutiva e não voam. A primeira etapa para a mobilização dos triglicerídeos é por meio da ação das lipases do corpo gorduroso que catalisam a quebra dos triglicerídeos (ARRESE e SOULAGENS, 2010). Nossa análise obteve transcritos relacionados com o anabolismo e catabolismo de lipídeos no corpo gorduroso, como diacilglicerol transferase, lsd1 e fosfolipase a.

6.3. COMPARAÇÃO DOS TÚBULOS DE MALPIGHI COM CORPO GORDUROSO

Embora os túbulos de Malpighi estejam principalmente relacionados com a excreção e osmorregulação (WIGGLESWORTH, 1972; CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007) e o corpo gorduroso com o metabolismo intermediário (CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007) ambos estão envolvidos na imunidade, biossíntese de pigmentos oculares, detoxificação e metabolismo de compostos nitrogenados.

6.3.1. Imunidade

A imunidade inata é um mecanismo importante para a resistência à patógenos em insetos e a presença destes é reconhecida por vários receptores celulares que desencadeiam a ativação de cascatas proteolíticas que levam a: (1) melanização que sequestra e mata o patógeno invasor; (2) opsonização e subsequente fagocitose; e (3) síntese de uma variedade de peptídeos antimicrobianos no corpo gorduroso seguida de secreção para a hemolinfa (HOFFMANN, 2003; ATTARDO et al., 2006).

Em *Drosophila* as vias *toll* e *imd* levam à produção de sete peptídeos antimicrobianos (HOFFMAN, 2003; McGETTIGAN et al., 2005). A ativação da via *toll* é estritamente dependente da proteína *spatzle*, que está relacionada com resposta à infecção por fungos e bactérias Gram-positivas. Os receptores *toll* possuem funções específicas no desenvolvimento, com a proteína *toll* sendo também recrutada para a defesa do organismo. A via *imd* é primariamente, mas não exclusivamente, relacionada com a defesa contra bactérias Gram-negativas e os peptídeos controlados por essa via são: Diptericina, Drosocina, Cecropina e Atacina (HOFFMANN, 2003).

A Tabela 9 mostra os transcritos identificados no corpo gorduroso de *Z. morio* que possuem a inferência de estarem envolvidos com o reconhecimento de patógenos, ativação de transdução de sinais das vias *toll* e *imd*, e cascatas de melanização.

Tabela 9: Transcritos do corpo gorduroso de larvas de *Z. morio* que são relacionados com a imunidade.

Processo	Transcrito
Melanização	Modular serina protease
	Proteína de ligação à bactéria Gram-negativa
	Proteína de reconhecimento peptidoglicano
	Atacina A
Via da imunidade inata e efetores	<i>Spatzle</i> 4 e 7
	<i>Easter</i>
	<i>Pelle</i>
	<i>Dorsal</i>
	<i>Toll</i> 1
	<i>Cactus</i>
Apoptose	Receptor <i>Scavenger</i>
Inibidores de serina protease	Inibidor de serina protease 3
	Serpina 20, 24, 21, 19, 18, b6, 3,17 e b3
Proteínas quinases	MAP quinase
	Cdk 5
	Quinase ligada-integrina
Lectinas	Galectina
	Lectina tipo C
Outros processos relacionados com imunidade	Fator de crescimento disco imaginal 2 e 4
	Malvolio x1
	<i>early-staged encapsulation-inducing</i> de 56 kDa

Comparativamente, a análise do transcriptoma dos túbulos de *Z. morio*, que também possuem papel significativo na imunidade por meio da secreção de peptídios antimicrobianos (NAPPI et al., 2000), possui transcritos que são inferidos estarem envolvidos na via de resposta imune *toll*; receptor de proteína *toll*, proteína *spatzle* 3, *tube* (não encontrada no corpo gorduroso), *atacina*, *pelle* que possui um domínio serina-

treonina quinase, e *cactus*. Ambos os tecidos expressaram o peptídeo atacina em baixa abundância, entretanto, isso evidencia que estes tecidos atuam temporalmente na síntese de peptídeos antimicrobianos.

6.3.2. Órgãos endócrinos

Em insetos, os principais hormônios esteróides são aqueles relacionados com a ecdise, a ecdisona ou 20-hidroxiecdisona. Os precursores desta molécula são sintetizados na glândula protorácica, entretanto, a reação final da síntese ocorre em outros tecidos, como corpo gorduroso, túbulos de Malpighi e intestino. O citocromo P450 CYP314A1 hidroxila a alfa-ecdisona para originar a forma ativa do hormônio, 20E (CHAPMAN, 2008; CANAVOSO et al., 2001). Em ambos os tecidos analisados de *Z. morio* foram encontrados transcritos similares ao CYP314A1, isso é esperado devido as larvas estarem no último ínstar de desenvolvimento.

6.3.3. Detoxificação

O metabolismo de xenobióticos em mamíferos e em outros organismos pode ocorrer por dois processos: funcionalização da molécula (Fase I) e por reações de conjugação, como com CoA e aminoácidos (Fase II); tais vias tornam a molécula mais hidrofílica facilitando sua excreção. As enzimas que participam da fase I catalisam reações de oxidorredução, e as que estão envolvidas na fase II introduzem nos xenobióticos grupos metil, sulfatos, glutaciona e aminoácidos (KNIGHTS e DROGEMULLER, 2000).

Os túbulos de Malpighi e corpo gorduroso participam na detoxificação de compostos endógenos e exógenos, como inseticidas. Além disso, os túbulos também excretam esses compostos e é bem conhecido que eles expressam citocromos P450, glutaciona S-transferases, álcool desidrogenase e transportadores ABC (WANG et al., 2004; DOW, 2009; CHACHINE et al., 2012).

Detoxificação também pode ocorrer por hidrólise, na qual carboxilesterases são capazes de catalisar a hidrólise de piretróides e organofosfatos (ZHANG et al., 2016). O corpo gorduroso e túbulos de *Z. morio* exibiram transcritos identificados como carboxilesterases.

6.3.3.1. Citocromos P450

Citocromos P450 são encontrados no retículo endoplasmático dos eucariotos e requerem NADPH. Estas enzimas atuam no metabolismo de compostos endógenos e xenobioticos, catalisando múltiplas reações oxidativas em seus substratos. Estes citocromos possuem como característica marcante a sua grande variedade de substratos que é devido ao número elevado de isoformas que ocorrem nos indivíduos (SCOTT, 1999). A expressão de citocromos P450 em insetos ocorre em vários tecidos, como: sistema nervoso, intestino, corpo gorduroso, túbulos de Malpighi, antena e intestino. Em insetos, essas enzimas metabolizam uma grande variedade de compostos endógenos; hormônio juvenil, ecdisteróides, feromônios e seus análogos; bem como compostos exógenos, como: aleloquímicos e inseticidas (SCOTT e WEN, 2001).

A Fig. 20 mostra os transcritos que possuem a inferência de serem citocromos P450 do corpo gorduroso e túbulos de Malpighi de larvas de *Z. morio*. Algumas isoformas são expressas em ambos os tecidos de *Zophobas*. A análise dos padrões de expressão de P450 em embriões e larvas de *D. melanogaster* mostrou que nos túbulos das larvas houve a expressão de 17 citocromos P450 e no corpo gorduroso 9, sendo que *Cyp4p2* e *Cyp4s3* foram exclusivos deste tecido. Em ambos os tecidos houve a expressão dos seguintes citocromos: 12d1, 4e3, 6g1, 6w1, 314a1 e 4p3 (CHUNG et al., 2008).

Os citocromos encontrados em nossa análise estão envolvidos com a biossíntese de ecdisona (18a1, 306a1, 314a1, 315a1), metabolismo de inseticidas e outros xenobióticos (1a1, 6a2, 6bq11, 6bq2, 6bq4), e metabolismo de ácido graxo (4c1). Ressalta-se que vários citocromos P450 encontrados ainda não tiveram sua função caracterizada. Os transcritos similares à essas enzimas presentes tanto nos túbulos como corpo gorduroso estão envolvidos no metabolismo de compostos exógenos e endógenos. O citocromo P450 mais abundante no corpo gorduroso foi 304a1 (FPKM 132,46), que pode estar relacionado ao metabolismo de hormônio e quebra de inseticidas (ADAMS et al., 2000). Nos túbulos, essa isoforma teve baixa abundância (FPKM 2,89), enquanto que 346b2 exibiu a maior abundância neste tecido (FPKM 172,58), entretanto, as funções relacionadas à essa isoforma ainda não foram descritas.

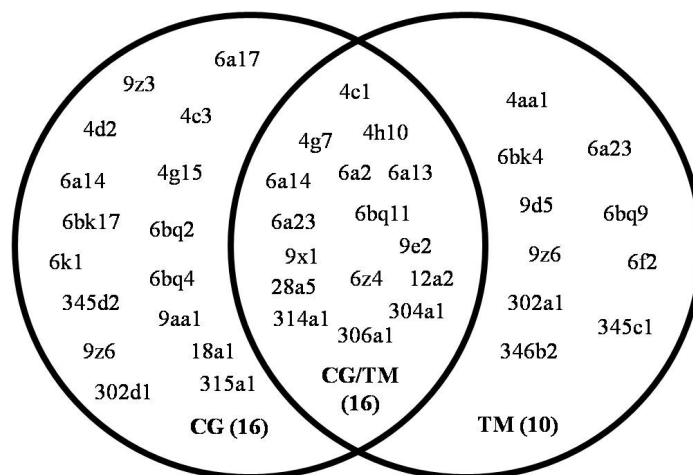


Figura 20: Diagrama representando os transcritos similares à citocromos P450 no corpo gorduroso e túbulos de Malpighi de larvas de *Z. morio*.

6.3.3.2. Glutathione S-transferases

Glutathione transferases (GSTs) catalizam reações de conjugações de substratos eletrofílicos com o grupo tiol de glutathione reduzida (GSH), removem da célula espécies reativas de oxigênio e também participam da fase II do metabolismo de xenobióticos, que resultam em compostos mais solúveis em água que são rapidamente excretados (LI et al., 2009; SHEEHAN et al, 2001). Seus substratos mais comuns são as quinonas, aldeídos, cetonas e ésteres. A presença dessas enzimas também está relacionada com a resistência a inseticidas organofosforados e dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (SHEEHAN et al, 2001).

As GSTs podem ser classificadas de acordo com a sua localização celular; microsomal, citosólica e um terceiro grupo (classe Kappa) que é encontrado nas mitocôndrias de mamíferos e peroxissomos. Em insetos, existem seis classes de GSTs citosólicas: delta, epsilon, ômega, sigma, theta e zeta, sendo que as classes delta e epsilon são únicas nesse grupo, e em *D. melanogaster* e *A. gambiae* essas duas classes foram importantes para a adaptação dessas espécies em seus ambientes (ENAYATI et al., 2005; LIU et al., 2015). Um pequeno grupo de glutathione S-transferase é altamente expresso nos túbulos de *Drosophila*, sugerindo que essas enzimas podem ter papéis importantes na fisiologia e bioquímica deste tecido (WANG et al., 2004).

O corpo gorduroso de *Z. morio* exibiu todas as classes de GSTs citadas e os túbulos não exibiram apenas a classe zeta. GSTs delta e epsilon classes estão envolvidas no metabolismo de produtos químicos alógenos e a classe sigma está relacionada a

funções constitutivas e também metabolismo de inseticidas (LIU et al., 2015). Como citado anteriormente, um dos transcritos mais abundantes nos túbulos é uma GST sigma (FPKM 3303,65), enquanto que no corpo gorduroso uma GST epsilon foi a mais abundante (FPKM 306,09). Em *T. molitor*, uma GST da classe epsilon foi especificamente distribuída no corpo gorduroso e entre as GSTs predominantemente expressas nos túbulos de Malpighi uma delas pertencem a classe sigma (LIU et al., 2015).

6.3.3.3. Álcool desidrogenase

A enzima melhor conhecida que participa da detoxificação nos túbulos é a álcool desidrogenase, considerada um dos genes clássicos de *Drosophila* (DOW e DAVIES, 2006). A presença de álcool desidrogenase in *Drosophila* é vista como uma adaptação evolucionária dos mosquitos à presença de etanol formado nas frutas em início de decomposição (DOW e DAVIES, 2001). O álcool é primeiro convertido à acetaldeído pela álcool desidrogenase e em seguida a enzima aldeído desidrogenase o converte à acetato. Os substratos da álcool desidrogenase incluem: álcoois alifáticos e alicíclicos e compostos aromáticos endógenos e exógenos (OPPERMANN e MASER, 2000).

Nos túbulos de Malpighi essas enzimas atuam na proteção contra os efeitos tóxicos do álcool neste tecido (ZHONG et al., 2013). Nos túbulos, espera-se que o transporte ativo de compostos e reações de detoxificação ocorram nas células principais, entretanto, a atividade da álcool desidrogenase foi detectada nas células estreladas de *Drosophila* (DOW e DAVIES, 2001). Atividade do álcool desidrogenase também é encontrada no intestino e corpo gorduroso, e atividade da aldeído desidrogenase é maior no intestino do que no corpo gorduroso de *Drosophila* (HEINSTRAS et al., 1989).

A abundância da álcool desidrogenase nos túbulos de *Z. morio* foi baixa, entretanto, no corpo gorduroso um transcrito similar a essa enzima exibiu abundância de FPKM 1388,48. Em ambos os tecidos, aldeído desidrogenase teve baixa abundância. As larvas de *Z. morio* possuem dieta pobre em frutas em decomposição, portanto, a álcool desidrogenase desta larva pode ter como substratos compostos endógenos. Além da oxidação de álcoois, a álcool desidrogenase também cataliza a redução de quinonas (OPPERMANN e MASER, 2000).

6.3.4. Metabolismo de nitrogênio

Insetos terrestres possuem um sistema de excreção uricotélico, em que o nitrogênio metabólico derivado do metabolismo das purinas e aminoácidos é excretado na forma de ácido úrico (Fig. 21). O corpo gorduroso é o principal local para a síntese do ácido úrico em insetos e frequentemente o ácido úrico é transportado para os túbulos de Malpighi e intestino posterior (NATION, 2015).

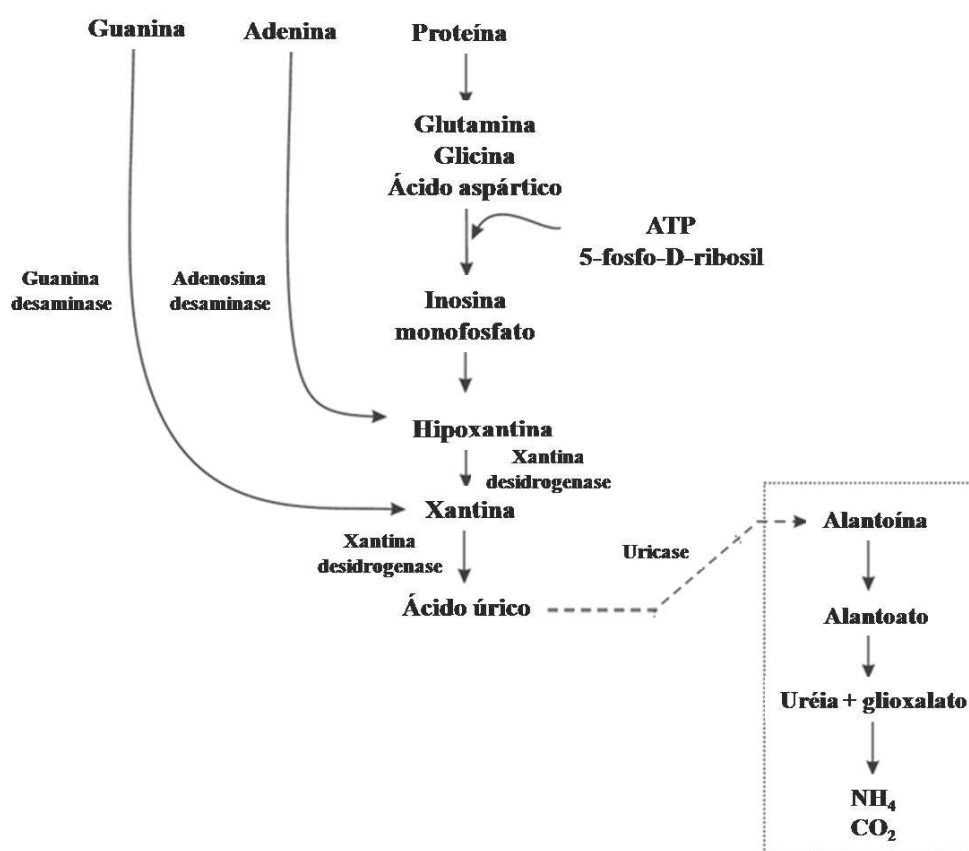


Figura 21: Via para a síntese de ácido úrico a partir de ácidos nucleicos e proteínas. O intermediário inosina monofosfato requer ATP para sua formação. Os passos da síntese de amônia e dióxido de carbono não ocorrem nos insetos. Adaptado de: KLOWDEN, 2007.

Os seguintes transcritos relacionados com a via de formação de ácido úrico foram encontrados em ambos os tecidos analisados: xantina desidrogenase, guanina desaminase e adenosina desaminase. Dessa forma, ambos os tecidos possuem a capacidade de metabolizar purinas e formar ácido úrico para excreção. Entretanto, transcritos similares à xantina desidrogenase no corpo gorduroso exibiram menor abundância do que nos

túbulos. A riqueza de produtos gênicos desta via pode estar relacionada com a dieta destas larvas, pois o farelo de trigo é considerado uma importante fonte de proteínas em criações de animais, cada 28 g do farelo possui 4 g de proteína, sendo que o excesso dessa biomolécula gera nitrogênio que necessita ser metabolizado e excretado.

6.3.5. Biossíntese de pigmentos no corpo gorduroso e túbulos de Malpighi

Em *D. melanogaster*, a coloração dos olhos é devida a presença de dois tipos de pigmentos, omócromos (marrom) derivados do aminoácido triptofano e pteridinas (vermelho) sintetizadas a partir de guanosina trifosfato (SUMMERS et al., 1982).

A biossíntese de pigmentos omócromos em *Drosophila* envolve uma via com várias reações catalisadas por diferentes enzimas (Fig. 22). A principal função biológica da enzima triptofano oxigenase é degradar o excesso de triptofano, que pode ser excretado, armazenado na forma de quinurenina ou 3-hidroxiquinurenina para excreção ou convertido em xantomantina.

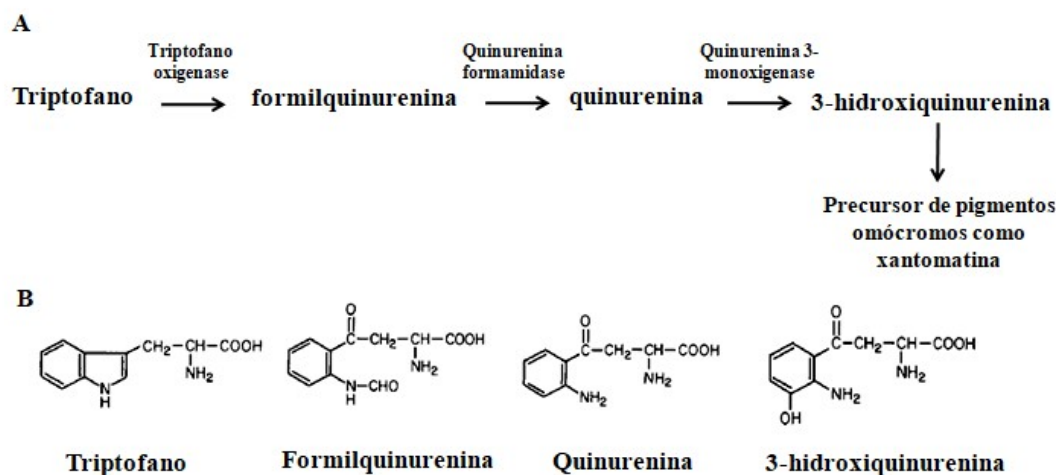


Figura 22: A: Via biossintética de pigmentos omócromos em insetos. B: Estruturas químicas dos compostos envolvidos na via biossintética de pigmentos omócromos. Adaptado de: SUMMERS et al., 1982.

A formação de quinurenina a partir do triptofano ocorre ao longo do desenvolvimento do indivíduo e nas larvas, o principal local para a síntese de quinurenina em larvas é o corpo gorduroso, enquanto que no adulto em desenvolvimento a síntese ocorre no corpo gorduroso e olhos. A enzima que catalisa a conversão da

quinurenina a 3-hidroxiquinurenina é encontrada principalmente nos túbulos de Malpighi de larvas e nos olhos de adultos em desenvolvimento. Desse modo, durante a fase larval a quinurenina formada no corpo gorduroso deve ser transportada para os túbulos para sua conversão em 3-hidroxiquinurenina. A 3-hidroxiquinurenina acumulada durante a fase larval parece ser sintetizada e armazenada principalmente nas células dos túbulos de Malpighi (SUMMERS et al., 1982). A quinurenina também pode ser convertida em ácido quinurênico pela catálise da enzima quinurenina aminotransferase e a 3-hidroxiquinurenina pode ser convertida em ácido xanturênico pela 3-hidroxiquinurenina transaminase (HAN et al., 2007).

Guanosina trifosfato é o precursor das pteridinas (Fig. 23A) e a enzima GTP ciclohidrolase cataliza a primeira reação da via biossintética. Após algumas reações, ocorre a formação da isoxantopterina (Fig. 23B) por meio da catálise da xantina desidrogenase, enzima que também converte a xantina em hipoxantina no metabolismo de purinas (SUMMERS et al., 1982).

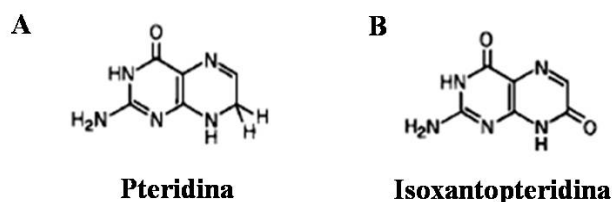


Figura 23: Estrutura química de (A) pteridina e (B) isoxantopteridina. Fonte: SUMMERS et al., 1982.

A correlação de fenótipos anormais em olhos e túbulos de Malpighi de larvas é bem documentado em mutantes de cor em *D. melanogaster*. Uma grande variedade de compostos que são tanto precursores de pigmentos oculares ou relacionados à esses pigmentos em estrutura química são encontrados em túbulos de larvas. Alguns mutantes de coloração de olhos de *D. melanogaster* podem possuir defeitos na capacidade de captar ou armazenar os precursores dos pigmentos. Dessa forma, os túbulos não somente estão envolvidos na síntese e armazenamentos dos precursores dos pigmentos, mas também possuem uma importante função na excreção de tais metabólitos (SUMMERS et al., 1982; DOW e DAVIES, 2003).

Enzimas envolvidas na biossíntese desses pigmentos são encontradas em diferentes tecidos, as enzimas triptofano oxigenase e xantina desidrogenase são encontradas no corpo gorduroso e túbulos de Malpighi; quinurenina 3-monoxigenase nos

túbulos; e a quinurenina formamidase no corpo gorduroso e outros tecidos (SUMMERS et al., 1982). Estes dados são corroborados com nossos resultados, pois encontramos as enzimas citadas nos túbulos e corpo gorduroso de larvas *Z. morio*, entretanto, em ambos os tecidos essas enzimas mostraram baixa abundância. A enzima triptofano oxigenase, por exemplo, encontrada em ambos os tecidos exibiu abundância FPKM 17,97 no corpo gorduroso e FPKM 4,05 nos túbulos.

Os túbulos e corpo gorduroso de *Z. morio* também possuem transcritos similares a quinurenina aminotransferase, no corpo gorduroso sua abundância é baixa, entretanto, nos túbulos um transcrito exibiu abundância de FPKM 133,28. A abundância deste transcrito foi a maior quando comparada com os outros transcritos relacionados com a via do triptofano para a síntese de pigmentos omócromos. Esses dados podem indicar que em larvas de *Z. morio* a maior parte da quinurenina produzida é convertida em ácido quinurênico.

6.4. Função das hexamerinas nos túbulos de Malpighi

Hexamerinas de insetos evoluíram das hemocianinas de crustáceos, mas perderam a capacidade de se ligar ao oxigênio (BURMESTER et al, 1998). Hemocianinas estão presentes em Artropoda e Mollusca, embora essas proteínas tenham evoluído independentemente nestes filos. Hemocianinas de artrópodes são hexâmeros com subunidades que possuem em torno de 75 kDa e já foram identificadas em Onychophora, Chelicerata, crustáceos malacostracos, Myriapoda e em Plecoptera (BURMESTER e HANKELN, 2007). As hexamerinas são constituídas por seis subunidades idênticas ou muito semelhantes e cada uma possui cerca de 80 kDa. Estas proteínas já foram isoladas em várias espécies de insetos e podem ser encontradas acumuladas na hemolinfa nos estágios larvais (BURMESTER, 1999).

Sugere-se que o acúmulo de hexamerinas na fase larval tem a função de armazenamento de aminoácidos para o fornecimento destas moléculas em estágios em que o indivíduo não se alimenta para a síntese de tecidos e proteínas do exoesqueleto (BURMESTER, 1999). Além disto, algumas hexamerinas possuem a capacidade de se ligar a pequenos compostos orgânicos, como por exemplo, a riboflavina em Lepidoptera ou hormônios juvenis em Orthoptera (BURMESTER et al., 1998). Uma proteína de armazenamento que pode se ligar a alguns inseticidas foi isolada da hemolinfa de larvas

de *Heliothis zea* (Lepidoptera). Devido ao seu alto conteúdo de aminoácidos aromáticos, essa proteína foi denominada de arilforina e possui alta afinidade por certos xenobioticos, como a dieldrina (inseticida) e trifluralina (herbicida), podendo atuar na detoxificação de xenobioticos (HAUNERLAND e BOWERS, 1986).

Em Diptera, duas classes diferentes de hexamerinas são expressas: arilforinas ou LSP-1, que possuem altos níveis de grupos aromáticos e metionina; e LSP-2, que possuem baixos níveis de grupos aromáticos e metionina (BURMESTER et al., 1997). As LSPs-1 são associadas com armazenamento, formação de cutícula e transporte de ecdisona, enquanto que LSPs-2 estão relacionadas somente com armazenamento, entretanto, em *C. vicina* LSPs-2 possuem funções ainda desconhecidas (BURMESTER et al., 1997; BURMESTER, 1999). Hexamerinas, como a LSP-1 de *C. vicina*, podem se ligar a ecdisteróides na fase larval. LSPs-1 também podem estar envolvidas na formação da cutícula, sendo que essas proteínas são incorporadas para uma matriz e subsequentemente sofrem reticulação (BURMESTER, 1999).

Alguns estudos já apontaram a expressão de hexamerinas em outros tecidos além do corpo gorduroso, como as proteínas Hex-1 e Hex-2 do cupim *Reticulitermes flavipes* que são expressas na hemolinfa, cabeça e corpo gorduroso (ZHOU et al., 2006).

Um estudo sobre a expressão de uma hexamerina, denominada *storage protein-2*, na larva de *Hyphantria cunea* mostrou que houve expressão desta proteína nos túbulos, embora seja menos expressa quando comparada com o corpo gorduroso. Supõe-se que essa hexamerina poderia possuir alguma função específica neste tecido, talvez relacionada com a excreção, uma vez que já foi demonstrado que essas proteínas possuem diversos papéis biológicos em outros grupos de insetos, como o transporte de xenobioticos e riboflavina (HWANG et al., 2001).

Foi observado que o aumento de uma hexamerina (P82) de *Heliothis virescens* que transporta riboflavina foi acompanhado pelo aumento do conteúdo de riboflavina na hemolinfa, túbulos de Malpighi e testículos (MILLER e SILHACEK, 1993). Entretanto, a maior parte do conteúdo de riboflavina acumulado por meio da alimentação é excretado pelos túbulos de Malpighi antes mesmo do aumento da concentração da hexamerina que se liga à esse composto (MAGEE et al., 1994).

Na lagarta de beterraba, *Spodoptera exigua*, a proteína de armazenamento *SeHex* é expressa no corpo gorduroso, cutícula, intestino e túbulos de Malpighi; e a *SeSPI* é expressa no corpo gorduroso, túbulos de Malpighi e traquéia. O RNA de interferência

mostrou que essas hexamerinas possuem importantes funções na metamorfose, reprodução e no desenvolvimento do inseto. Tais resultados revelam um método em potencial para controlar essa espécie, que é uma peste, por meio da interferência na regulação das proteínas de armazenamento (TANG et al., 2010).

A função das hexamerinas nos túbulos ainda permanece desconhecida, possivelmente poderiam estar envolvidas no transporte e excreção de compostos, uma vez que essas proteínas podem se ligar a compostos, como riboflavina, hormônio juvenil, ecdisona, biliverdina e xenobióticos (HAUNERLAND e BOWERS, 1986; MILLER e SILHACEK, 1993; BURMESTER et al, 1998). A identidade do alinhamento da estrutura primária da hexamerina encontrada nos túbulos de *Z. morio* com as hexamerinas que se ligam aos compostos citados variou 32-43%, assim as hexamerinas de *Zophobas* podem não estar envolvidas com a ligação destes compostos

A análise genômica dos túbulos de Malpighi de *Drosophila* (WANG et al., 2004; DOW e DAVIES, 2006; DOW, 2009), o transcriptoma dos túbulos de *A. albopictus* (ESQUIVEL et al., 2016) e o estudo proteômico dos túbulos de *B. mori* (ZHONG et al., 2013) não ressaltaram a presença de hexamerinas em suas análises deste tecido. Entretanto, nos túbulos de larvas de *A. aegypti* um gene de hexamerina é *upregulated* quando comparado com esse tecido de adulto e possui abundância de FPKM 682,97 (LI et al., 2017). Os túbulos de *Z. morio* possuem hexamerina com abundância de FPKM 79,32, que é baixa quando comparada com a abundância deste transcrito no corpo gorduroso (Tabela 8), tecido onde essas proteínas são comumente expressas. Notavelmente, as lanternas do díptero bioluminescente *A. luminosa*, que derivam dos túbulos de Malpighi, apresentaram uma abundância incomum de transcritos similares à hexamerinas, indicando seu possível envolvimento com o processo de bioluminescência.

6.5. FUNÇÃO DAS AMP-CoA LIGASES NOS TÚBULOS DE MALPIGHI E CORPO GORDUROSO

As AMP-ligases catalisam a adenilação que é um processo biológico utilizado para ativar substratos carboxílicos por meio da condensação com ATP com a liberação do pirofosfato e formação do carboxilato ativado. A enzima que catalisa a formação do adenilato também participa do segundo passo, onde um nucleófilo (amina, álcool ou tiol) reage com o intermediário para formação do produto desejado liberando AMP (VIVIANI, 2002; SCHMEIZ e NAISMITH, 2009). As AMP-CoA ligases estão

relacionadas à várias vias metabólicas: como oxidação e biossíntese de ácidos graxos, ativação de aminoácidos, bioluminescência em Coleoptera, ativação de fenilpropanóides em vegetais e metabolismo de xenobióticos em fígado e rins de mamíferos (KNIGHTS e DROGEMULLER, 2000; STUIBLE et al., 2000; VIVIANI, 2002; SCHMEIZ e NAISMITH, 2009). As enzimas acil-CoA sintetases em mamíferos, além de estarem associadas à ativação de ácidos graxos de cadeia média, também estão relacionadas com a fase II na detoxificação de xenobióticos e exibem uma variedade de substratos, como 4-clorobenzoato, 4-aminobenzoato e hexanoato (KNIGHTS e DROGEMULLER, 2000).

Entretanto, estudos sobre enzimas da família das AMP-CoA ligases em insetos, com exceção de luciferases de coleópteros, são ausentes. A origem, evolução e diversificação desta importante família de enzimas permanecem um mistério. Enzimas tipo luciferases (protoluciferase) encontradas em Coleoptera não bioluminescentes, como *Z.morio*, podem servir como modelo para o entendimento do surgimento e evolução da bioluminescência e novas funções metabólicas das ligases nesse grupo de insetos (VIVIANI et al., 2009).

Nossos resultados indicaram que os túbulos e corpo gorduroso de *Zophobas* possuem várias isoformas de AMP-CoA ligases e que são similares à 4-cumarato-ligases (4CLs), exibindo identidade de ~ 40%. A comparação dos transcriptomas de tecidos fotogênicos e não-fotogênicos dos coleópteros bioluminescentes *P. hirtus* com o a região abdominal da espécie não-bioluminescente *Chauliognathus opacus* também indicou a presença de ligases similares à 4CLs, 13 cópias nas lanternas e uma cópia no corpo gorduroso de *P. hirtus*, e em *C. opacus* aproximadamente 40 cópias (AMARAL et al., 2017a). Alinhamentos entre essas ligases de *C. opacus* e do corpo gorduroso de *Z. morio* exibiram 21-52% de identidade. Esses resultados indicam que insetos, pelo menos Coleoptera, expressam distintas isoformas de CoA ligases em diferentes tecidos. Plantas também expressam várias isoformas de 4CLs em diferentes tecidos e é proposto que as isoformas poderiam ter se especializado em ativar diferentes substratos (SCHNEIDER et al., 2003).

A análise filogenética das AMP-CoA ligases (Fig. 16) mostrou que as relações entre 4CLs de *A. thaliana* e de *Streptomyces*, AMP-CoA ligases de *C. quinquefasciatus* e de *A. aegypti*, e 2-succinilbenzoato-CoA ligase não são bem definidas, e as ligases de *Zophobas* obtidas nesta análise são mais próximas de 4CLs e outras AMP-CoA ligases de insetos. Isso pode indicar que a divergência destes 3 subgrupos de AMP-CoA ligases

é recente. Além disso, a baixa similaridade destas proteínas com as atuais luciferases de besouros indica claramente que os substratos carboxílicos delas são distintos.

6.5.1. Inferência dos substratos das AMP-CoA ligases de *Z. morio*

Considerando que as AMP-CoA ligases presentes nos túbulos de Malpighi e no corpo gorduroso de *Z. morio* são similares à 4CLs, a comparação dos módulos de especificidade aos substratos carboxílicos das isoformas de 4CLs em vegetais com as ligases de *Z. morio* pode ajudar a inferir os possíveis substratos das ligases encontradas nestes tecidos. Em vegetais, as 4CLs catalizam a ativação de 4-cumarato e outros derivados do ácido cinâmico, como ácido ferúlico e caféico (Fig. 24), participando de uma série de reações conhecidas como metabolismo do fenilpropanóide nas plantas. Os compostos fenilpropanóides possuem diversas funções: componente estrutural (lignina e suberina), proteção contra estresse biótico e abiótico, moléculas sinalizadoras e pigmentos de flores (STUIBLE et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2003).

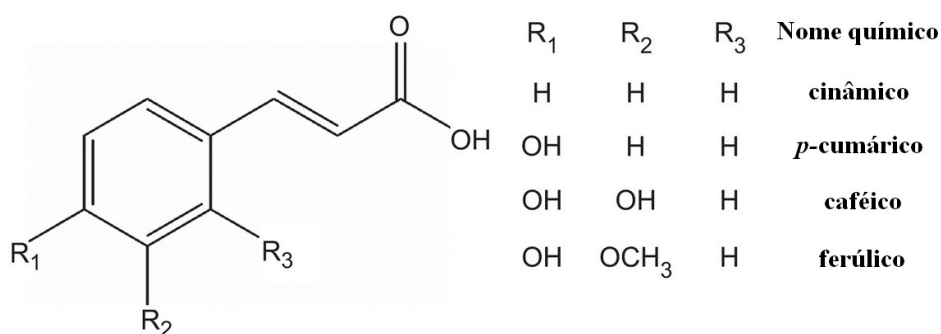


Figura 24: Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos. Adaptado de: ADISAKWATTANA et al., 2009.

A estrutura tridimensional do sítio de especificidade da isoforma At4CL2, que possui maior especificidade ao ácido caféico, propõe que os derivados de ácido cinâmico são posicionados no SBP (*substrate binding pocket*) de maneira estritamente orientada e que a ligação de hidrogênio entre N256 e o grupo 4-hidroxil do ácido cumárico e derivados estabilizam a orientação do substrato (Fig. 25) (SCHNEIDER et al., 2003). Na posição correspondente à 256 de At4CL2, as ligases de *Z. morio* exibiram um resíduo de treonina, que também poderia estabilizar os derivados de ácido cinâmico no SBP.

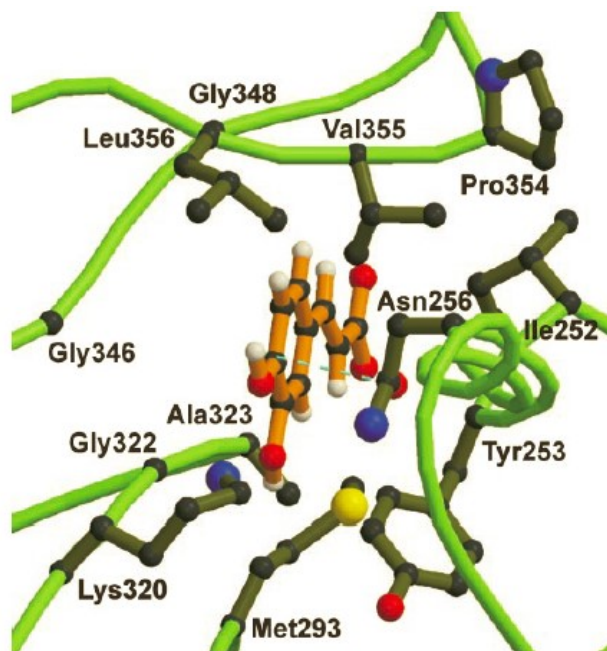


Figura 25: Modelo 3D do SBP da isoforma At4CL2. O modelo mostra os 12 resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação ao ácido caféico. A linha pontilhada representa uma ligação de hidrogênio. Fonte: SCHNEIDER et al., 2003.

A isoforma At4CL2 é inativa na presença de ácido ferúlico, entretanto, mutantes na posição 293 ou 320 que possuem aminoácidos pequenos, como leucina e prolina, ativam o ácido ferúlico. A enzima tipo selvagem exibe M293 e K320 e a presença destes resíduos volumosos impedem que o grupo 3-metoxi do ácido ferúlico se ligue no SBP por exclusão de tamanho do substrato. Nessas posições, as ligases de *Z. morio* também possuem resíduos volumosos, fenilalanina e valina, que, portanto, previnem a ativação de ácido ferúlico.

A exclusão por tamanho do substrato de acordo com o SBP também foi proposta para a isoforma 4CL1 de *Populus tomentosa* que possui preferencialmente como substrato o ácido cúmarico. Foi proposto para esta isoforma que o resíduo S240, que nas ligases de *Zophobas* é uma treonina, é essencial para ligação com o substrato, pois forma ligação de hidrogênio (HU et al., 2010). Algumas 4CLs de vegetais possuem uma deleção na V338 que permite que substratos maiores, como o ácido sinápico, possam entrar no SBP (HU et al., 2010). Nessa posição, as ligases de *Zophobas* exibem uma metionina que é um resíduo que apresenta uma cadeia lateral longa que também poderia não permitir a ligação de substratos maiores ao SBP. Portanto, pode ser inferido que as ligases de *Zophobas* também sejam capazes de ativar derivados de ácidos cinâmico, como o cumárico e caféico, exceto o ácido ferúlico e ácido sinápico.

A presença de enzimas tipo cumarato ligases em insetos é surpreendente, pois estas enzimas são exclusivas do metabolismo fenilpropanóide de vegetais. Como derivados do ácido cinâmico, como o cafêico, cumárico e ferúlico; são encontrados em farelo de trigo (ONYENEHO e HETTIARACHCHY, 1992), a presença de enzimas tipo cumarato ligases em túbulos de larvas de *Z. morio* poderia estar envolvida na ativação e detoxificação de ácidos fenólicos provenientes da dieta.

6.5.2. Comparação das AMP-CoA ligases dos túbulos de Malpighi com a enzima tipo luciferase

Uma enzima tipo luciferase (protoluciferase) que apresenta uma fraca atividade luminescente na presença de ATP e D-luciferina de vagalumes foi clonada dos túbulos de *Z. morio* (VIVIANI et al, 2009). Em ambos os tecidos analisados, os transcritos similares à AMP-CoA ligases exibiram identidade variável de 21-92% com a enzima tipo luciferase previamente clonada dos túbulos desta espécie. As ligases obtidas do transcriptoma apresentam em suas sequências o resíduo H281 que é invariável nas luciferases de vagalume (H245 da sequência de *P. pyralis*) e favorece a acomodação da luciferina (BRANCHINI et al., 1998). Entretanto, a enzima tipo luciferase previamente clonada dos túbulos possui um triptofano nessa posição (W208) que modifica a polaridade da cavidade e remove a ligação de hidrogênio com o grupo carboxila da luciferina. Na protoluciferase, a região CGYDCR é mais curta, portanto, muda drasticamente o volume desta região da cavidade que está relacionada com a ligação do anel benzotiazólico (PRADO et al., 2016). Nas AMP-CoA ligases analisadas, essa região aparentemente não é menor, mas ainda não temos dados se essas isoformas podem se ligar à luciferina. De modo geral, a protoluciferase, apesar de utilizar a luciferina como substrato alternativo, não possui requerimentos estruturais para aceitar D-luciferina como um bom substrato. De fato, essa enzima possui amplo espectro de substratos carboxílicos, entre os preferenciais seriam ácidos graxos de cadeia curta e 4-clorobenzoato (PRADO et al., 2016).

A função da enzima tipo luciferase e de outras AMP-CoA ligases nos túbulos de Malpighi permanecem desconhecidas, embora várias evidências apontam que a enzima tipo luciferase esteja envolvida na detoxificação/excreção de ácidos carboxílicos nos túbulos (PRADO et al., 2016).

Considerando-se que: (1) insetos não possuem o metabolismo fenilpropanóide como as plantas, (2) ácido graxo sintetases (AMP-CoA ligases) de mamíferos estão envolvidas com a fase II de detoxificação de xenobióticos carboxílicos nos rins (análogos aos túbulos de insetos) e fígados de mamíferos (KNIGHTS e DROGEMULLER, 2000), (3) a semelhança existente entre as ligases encontradas nos túbulos e corpo gorduroso em *Z. morio* e 4CLs de plantas que podem ativar vários substratos carboxílicos, e (4) que ácidos cumáricos desempenham um papel de defesa química contra insetos nas plantas, sugere-se que as enzimas tipo cumarato ligases nos túbulos possam participar do processo de excreção e detoxificação de ácidos oriundos da dieta de farelo de trigo, que possui ácidos fénólicos em sua composição, como o caféico, cumárico e ferúlico (ONYENEHO e HETTIARACHCHY, 1992). Alternativamente poderiam estar envolvidas no processo de ativação de ácidos estruturalmente semelhantes a ácidos do metabolismo fenilpropanóides de plantas na biossíntese de pigmentos de insetos.

6.6. RELAÇÃO MOLECULAR ENTRE OS TÚBULOS DE MALPIGHI E A ORIGEM DAS LANTERNAS NO DÍPTERO BIOLUMINESCENTE *Archnocampa* spp.

As lanternas do díptero bioluminescente *Archnocampa* derivam dos túbulos de Malpighi. Deste modo é interessante comparar o perfil transcricional destes órgãos ontogeneticamente relacionados, para melhor entender a diversificação funcional a nível molecular, especialmente a relação entre as funções originais dos túbulos de Malpighi e a origem da bioluminescência em dípteros.

Pouco se sabe sobre os genes expressos nas lanternas de organismos bioluminescentes. A primeira análise do perfil dos transcritos das lanternas de *A. luminosa* indicou a abundância de enzimas AMP-CoA ligases, especialmente de hexamerinas, proteínas ribossomais, enzimas envolvidas em vias de detoxificação, proteínas de ligação, e outros (SILVA et al., 2015b). Uma análise posterior por sequenciamento de nova geração do transcriptoma das lanternas de *A. luminosa* em conjunto com a expressão diferencial do órgão luminoso em comparação com o resto do corpo identificou seis transcritos que podem estar envolvidos na bioluminescência. Três desses transcritos são proteínas que pertencem à superfamília das CoA ligases, superfamília que engloba as luciferases de vagalumes, sendo que estas três proteínas são possíveis candidatas a luciferase desta espécie. Os outros três transcritos diferencialmente

expressos nas lanternas foram as proteínas aminoacilase, proteína de ligação à fosfatidiletanolamina e glutathione S-transferase (SHARPE et al., 2015).

Uma análise dos genes expressos mais representativos nas lanternas do vagalume *Macrolampis* sp. mostrou alta porcentagem de produtos gênicos mitocondriais, o que é esperado em um tecido com muita atividade metabólica, e enzimas envolvidas na biossíntese e controle hormonal (VIVIANI et al., 2012). As lanternas laterais de *P. hirtus* expressaram transcritos relacionados a formação de cutícula, luciferases, enzimas de regeneração de luciferina (LRE), biossíntese de feromônios, e outros (AMARAL et al., 2017a). Embora o sistema bioluminescente encontrado em coleópteros seja evolutivamente distinto do sistema encontrado em dípteros (VIVIANI et al., 2002) pode-se fazer uma comparação funcional entre os transcritos gênicos presentes nessas lanternas.

Apesar de serem ontogeneticamente relacionados com os túbulos de Malpighi, as lanternas de *A. luminosa* não mostraram transcritos similares à transportadores de íons relacionados à produção de urina, aquaporinas e proteínas relacionadas à junções celulares comuns nos túbulos de Malpighi. As células das lanternas perderam suas características de células epiteliais ao adquirirem modificações celulares para a produção de luz (GREEN, 1979b), tal afirmação pode explicar a ausência dos transcritos citados que poderiam estar envolvidos na excreção e osmorregulação.

Embora as lanternas de *A. luminosa* não apresentem transcritos relacionados à osmorregulação, elas exibiram transcritos relacionados à detoxificação, como citocromos P450 (3 transcritos), glutathione S-transferases (11 transcritos) e álcool desidrogenase (2 transcritos), típicos dos túbulos de Malpighi (WANG et al., 2004; DOW, 2009; CHACHINE et al., 2012). As isoformas de citocromos P450 foram: 1A1, 6AS17 e 6a14, destes, apenas a isoforma 6a14 foi encontrada nos túbulos de *Z. morio* e esse citocromo P450 pode estar relacionado ao metabolismo de hormônios e detoxificação de xenobióticos. Em humanos, o P450 1A1 possui substratos endógenos, como ácido araquidônico, e xenobióticos (WALSH et al., 2013). Os transcritos similares à glutathione S-transferase pertencem à classe ômega, teta, delta epsilon. Glutathionas da classe delta e epsilon estão envolvidas no metabolismo de produtos químicos alogênicos (LIU et al., 2015). A presença de enzimas de vias de detoxificação indica que, embora tenha ocorrido a modificação das células tubulares para a produção de luz, essas vias foram preservadas nessas células.

Em relação ao metabolismo do nitrogênio, que ocorre nos túbulos de Malpighi, nas lanternas foi obtida apenas uma sequência similar a uricase e nenhuma outra enzima desta via. A enzima uricase (urato oxidase) cataliza a quebra de ácido úrico formando a alantoína (KLOWDEN, 2007). Em *Drosophila*, a uricase é expressa nos olhos de adultos e nas células principais dos túbulos em larvas de 3º instar e adultos. Espécies relacionadas de *Drosophila* também apresentaram a expressão dessa enzima em certas fases de vida. Uma provável explicação é que a via da uricase para a síntese da alantoína fornece uma capacidade extra em estágios de vida, como no último estágio larval, em que o indivíduo aumenta intensivamente a ingestão de alimentos (DOW e DAVIES, 2003). Nos túbulos de *Z. morio* não foi obtido nenhum transcrito que possui a predição de ser essa enzima, portanto, larvas de *Z. morio* (último estágio larval) não ocorre a formação de alantoína para excreção como em algumas espécies de *Drosophila*. Pode-se supor que nas lanternas de *A. luminosa* o ácido úrico formado no corpo gorduroso e nos túbulos é convertido para alantoína para armazenamento ou excreção.

Foi proposto que o ácido xanturênico, derivado da via do metabolismo do triptofano que ocorre nos túbulos, pode ser um dos precursores da luciferina de *A. luminosa* (WATKINS, 2016), este ácido pode ser formado a partir da 3-hidroxiquinurenina por meio da catálise da 3-hidroxiquinurenina transaminase (HAN et al., 2007). Intrigantemente não foi obtida nenhuma sequência similar à enzimas desta via nas lanternas de *Arachnocampa*. Se algum dos precursores da luciferina for qualquer intermediário da via de pigmentos omócromos (Fig. 20) pode-se supor que ele seja sintetizado em outro tecido, como a porção anterior dos túbulos, e transportado para as lanternas.

Recentemente, Trowell et al. (2016) descreveram a clonagem e caracterização da luciferase de *A. richardsae* (~59 kDa). Esta enzima apresentou alto grau de identidade com a enzima tipo luciferase de *A. luminosa* clonada pelo Prof. Dr. Vadim Viviani (~95%). Os autores também afirmaram que a luciferina de *Arachnocampa* é a mesma de vagalumes, e que essa enzima produziria luz azul na presença de D-luciferina de vagalumes. Entretanto, Viviani et al. (2002) mostraram que a enzima tipo luciferase de *Arachnocampa luminosa* não é reativa com luciferina de vagalumes.

6.6.1. Função das hexamerinas nas lanternas de *A. luminosa*

Surpreendentemente, em nossa análise, proteínas da família das hexamerinas foram os transcritos mais abundantes encontrados nas lanternas de *A. luminosa*. Essas proteínas são mais similares à hexamerinas de *C. quinquefasciatus*, mostrando cerca de 60% de identidade, o que foi corroborado por nossa análise filogenética que formou um grupo com alto valor de suporte para as hexamerinas de Diptera (Fig. 14). A presença de hexamerinas nas lanternas de *A. luminosa* também foi confirmada por espectrometria de massas de bandas (75 kDa) excisadas de gel de SDS-PAGE de amostras parcialmente purificadas das lanternas (SILVA et al., 2015b).

Em bactérias o FMNH₂, derivado de riboflavina, constitui a luciferina e na reação bioluminescente a luciferase heterodimérica (α - β) catalisa a oxidação da flavina e de aldeído de cadeia longa (FRANCKMAN et al, 1990). Proteínas que se ligam a riboflavinas são uma subfamília dentro das hexamerinas e já foram identificadas em duas ordens de insetos, Lepidoptera e Coleoptera. Uma hexamerina que se liga a riboflavina foi isolada da hemolinfa de *H. cecropia*, sendo confirmada a presença de um grupo sulfidríla que é responsável pela sua ligação (MAGGEE et al, 1994).

Devido a sua abundância relativa, pode-se inferir que as hexamerinas representam uma importante função na fisiologia e bioluminescência nas lanternas de *Arachnocampa*. Devido ao fato de algumas hexamerinas poderem se ligar a pequenas moléculas, como a LSP-1 que é próxima das hexamerinas de *A. luminosa*, é possível que nas lanternas elas possam estar envolvidas na ligação e armazenamento de luciferina, molécula que é muito instável nessa espécie.

6.6.2. Função das enzimas tipo luciferase nas lanternas de *A. luminosa*

Devido algumas enzimas tipo luciferases em insetos coleópteros não bioluminescentes mostrarem fraca bioluminescência em presença de D-luciferina, é possível que as enzimas tipo luciferases de *A. luminosa* também possam adenilar e talvez oxidar sua respectiva luciferina produzindo luz de maneira similar às luciferases de Coleoptera. Entretanto, não foi obtida atividade de luminescência quando a enzima tipo luciferase de *A. luminosa* clonada por PCR foi testada com D-luciferina de vagalume (SILVA et al., 2015b). A falta de atividade pode ser devida ao fato desta

enzima tipo luciferase não corresponder de fato a luciferase de *Arachnocampa*, ou ainda, pela ausência de algum co-fator necessário na reação de bioluminescência.

Notavelmente, foi relatado que enzimas tipo luciferase na espécie *A. richardsae* constituem a luciferase deste sistema bioluminescente e que a luciferina de *Arachnocampa* é igual aquela de vagalumes (TROWELL et al., 2016), um resultado que nunca foi corroborado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Vadim Viviani, apesar de inúmeras tentativas e do fato da luciferina de vagalumes não ter estrutura química compatível com a emissão de quimioluminescência azul (VIVIANI et al., 2002, comunicação pessoal).

A análise filogenética mostrou que a enzima tipo luciferase de *A. luminosa*, previamente isolada pelo Prof. Dr. Vadim Viviani, que é igual aos transcritos obtidos em nossa análise, é mais próxima da enzima tipo luciferase de *D. melanogaster* (CG6178) (Fig. 16), um produto gênico que mostrou ter atividade luciferásica na presença de um análogo de adenilato de luciferina de vagalume (MOFFORD et al., 2014).

6.6.3. Relação entre CoA-ligases, detoxificação de xenobióticos carboxílicos e origem da bioluminescência nos túbulos de Malpighi

A presença de enzimas tipo luciferase nos túbulos de Malpighi de *Zophobas*, uma espécie não bioluminescente, que produz bioluminescência na presença de ATP e luciferina de vagalume, um xenobiótico para esta espécie; leva a suposição que AMP-CoA ligases podem estar envolvidas na detoxificação de xenobióticos carboxílicos ou excreção neste tecido, de forma análoga às acil-CoA sintetases nos rins (VIVIANI et al., 2009). A obtenção de AMP-CoA ligases, similares à 4-cumarato ligases, nos túbulos também indicam que essas enzimas poderiam atuar na detoxificação de derivados de ácidos cumáricos provenientes da dieta, já que alguns destes compostos produzidos por plantas tem função de defesa contra insetos. A presença de enzimas tipo luciferases e enzimas envolvidas em detoxificação nas lanternas de *A. luminosa* fornece forte evidência de uma relação evolutiva entre detoxificação de ácidos carboxílicos nos túbulos e a origem da bioluminescência em Diptera. O encontro fortuito entre uma AMP-CoA ligase ancestral generalista envolvida na detoxificação/excreção de substratos carboxílicos com um substrato potencialmente oxidável e

quimioluminescente pode ter originado as protoluciferases, levando a evolução de diferentes sistemas bioluminescentes em Diptera e Coleoptera (VIVIANI et al., 2009; 2010; SILVA et al., 2015b).

7. CONCLUSÕES

No conjunto, a análise dos transcriptomas dos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *Z. morio* mostrou a versatilidade fisiológica destes tecidos em uma larva de Coleoptera. Embora estes tecidos tenham uma função geral diferente nos insetos, eles compartilham algumas funções, como no metabolismo de nitrogênio; envolvimento na imunidade; metabolismo de compostos endógenos, como hormônios; detoxificação de compostos tóxicos e biossíntese de pigmentos. O mais interessante é a presença de AMP-CoA ligases nestes tecidos, especialmente enzimas tipo cumarato ligases que são exclusivas de plantas, e a sua possível associação com processos de detoxificação/excreção de ácidos cumáricos provenientes da dieta ou envolvidas no processo de ativação de ácidos estruturalmente semelhantes na biossíntese de pigmentos de insetos. Finalmente, a presença de enzimas tipo luciferase nos túbulos de Malpighi de besouros e nas lanternas de *A. luminosa*, que derivam dos túbulos, reforçam uma possível relação entre CoA ligases, detoxificação de ácidos carboxílicos aromáticos nos túbulos de Malpighi e origem e evolução da bioluminescência em Diptera.

8. PERSPECTIVAS

No presente projeto encontramos AMP-CoA ligases nos túbulos de Malpighi, cujas funções permanecem desconhecidas. Além disto, também foram encontradas em nosso estudo enzimas tipo-luciferases, que também são AMP-CoA-ligases, e abundância de proteínas da superfamília das hexamerinas nas lanternas de *Arachnocampa*, indicando sua implicação no processo de bioluminescência. Para melhor entender a função destes transcritos na fisiologia destes importantes órgãos em larvas de besouros e lanternas de dípteros, haverá necessidade de comparar o seu nível de expressão por técnicas de PCR em tempo real. Assim planejamos realizar a análise funcional das AMP-CoA ligases encontradas nos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *Zophobas morio*, enzimas tipo luciferases e hexamerinas de lanternas de *Arachoncampa* por meio da clonagem, expressão e caracterização destes produtos gênicos. O sequenciamento completo de AMP-CoA ligases dos túbulos e corpo gorduroso de *Z. morio* está sendo realizado e enzimas tipo luciferase estão sendo clonadas e investigadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASCAL, F., ZARDOYA, R., POSADA, D. 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**. 21:2104-2105.

ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**. 5461:2185-2195.

ADISAKWATTANA, S., CHANTARASINLAPIN, P., THAMMARAT, H., YIBCHOK-ANUN, S. 2009. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal α -glucosidase. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem**. 24:1194-1200.

AMARAL, D. T., SILVA, J. R., VIVIANI, V. R. 2017a. Transcriptional comparison of the photogenic and non-photogenic tissues of *Phrixothrix hirtus* (Coleoptera: Phengodidae) and non-luminescent *Chauliognathus opacus* (Coleoptera: Cantharidae) give insights on the origin of lanterns in railroad worms. **Gene Reports**. 7:78-86.

AMARAL, D. T., SILVA, J. R., VIVIANI, V. R. 2017b. Transcriptomes from the photogenic and non-photogenetic tissues and life stages of the *Aspisoma lineatum* firefly (Coleoptera: Lampyridae): Implications for the evolutionary origins of bioluminescence and its associated light organs. **Gene Reports**.

ANDREWS, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

ARRESE, E. L. e SOULAGES, J. L. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu. Rev. Entomol**. 55:207-225.

ATTARDO, G. M., STRICKLER-DINGLASAN, P., PERKIN, S. A. H., CALER, E., BONALDO, M. F., SOARES, M. B., EL-SAYEED, N., AKSOY, S. 2006. Analysis of fat body transcriptome from the adult tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. **Insect Mol. biol**. 15:411-424.

BACCETTI, B., CROVETTI, A., SANTINI, L. 1987. Light-producing organs in *Keroplatus tipuloides* Bosc and *K. reaumuri pentophthalmus* Giglio-Tos (Diptera: Mycetophilidae). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.** 16: 169-176.

BARTHOLOME, O., Van Den ACKERVEKEN, P., GIL, J. S., BONARDEAUX, O. B., LEPRINCE, P., FRANZEN, R., ROGISTER, B. 2017. Puzziling out synaptic vesicle 2 family members functions. **Front. Mol. Neurosci.** 10:148.

BASSOT, J. M. 1978. Les corps noirs, cellules géantes du Diptere mycetophilide lumineux *Platyura fultoni* et leur sécrétion mitochondriale. **C. R. Acad. Sc. Paris.** 286D:623-626.

BEYENBACH, K. W., SKAER, H., DOW, J. A. T. 2010. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. **Ann. Rev. Entomol.** 55:351-374.

BIOLOGIA CELULAR ATLAS DIGITAL - UFFRGS. 2009. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/biologiachelularatlas/memb3.htm>. Acesso em: 12 de Fevereiro de 2016.

BRANCHINI, B. R., MAGYAR, R. A., MURTIASHAW, M. H., ANDERSON, S. M., ZIMMER, M. 1998. Site-directed mutagenesis of histidine 245 in firefly luciferase: A proposed model of the active site. **Biochemistry.** 44:15311-15319.

BRANCHINI, B. R., SOUTHWORTH, T. L., MURTIASHAW, M. H., BOIJE, H., FLEET, S. E. 2003. **Biochemistry.** 42:10429-10436.

BRADLEY, T. J. 2009. Excretion. In: Encyclopedia of Insects. 2^a ed. Editores RESH, V. H. e CARDÉ, R. T. **Elsevier**, Burlington, USA. pgs. 334-338.

BURMESTER, T., MASSEY J. R., H. C., ZAKHARKIN, S. O., BENES, H. 1997. The evolution of hexamerins and phylogeny of insects. **J. Mol. Evol.** 47:93-108.

BURMESTER, T., MASSEY JR., H. C., ZAKHARKIN, S. O., BENES, H. 1998. The evolution of hexamerins and the phylogeny of insects. **J. Mol. Evol.** 47:93-108.

BURMESTER, T. 1999. Evolution and function of the insects hexamerins. **Eur. J. Entomol.** 96:213-225.

BURMESTER, T. e HANKELN, T. 2007. The respiratory proteins of insects. **J. Insect Physiol.** 53:285-294.

CALKINS, T. L. e PIERMARINI, P. M. 2015. Pharmacological and genetic evidence for Gap junctions as potential new insecticide targets in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS ONE.** 10(9).

CAMPBELL, E. M., BALL, A., HOPPLER, S., BOWMAN, A. S. 2008. Invertebrate aquaporins: a review. **J. Com. Phyol. B.** 178:935-955.

CANAVOSO, L. E., JOUNI, Z. E., KARNAS, K. J., PENNINGTON, J. E., WELLS, M. A. 2001. Fat metabolism in insects. **Annu. Rev. Nutr.** 21:23-46.

CANDY, D. J. 1985. Intermediary metabolism. In: Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. Editores KERKUT, G. A. e GILBERT, L. I. Pergamon Press Ltd. Oxford, England. pgs. 1-42.

CHACHINE, S. e O'DONNELL, M. J. 2010. Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. **J. Exp. Biol.** 214:462-468.

CHACHINE, S., CAMPOS, A., O'DONNELL, M. J. 2012. Genetic knockdown of a single organic anion transporter alters the expression of functionally related genes in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. **J. Exp. Biol.** 215:2601-2610.

CHAPMAN, R. F. (Ed.). In The insect: Structure and Function, 4^a ed. London: Cambridge University Press, 1998.

CHENG, D-J., XIA, Q-Y., ZHAO, P., WANG, Z-L., XU, H-F., LI, G-R., LU, C., XIANG, Z-H. 2006. EST-based profiling and comparison of gene expression in the silkworm fat body during metamorphosis. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 61:10-23.

CHIEN, S., REITER, L. T., BIER, E., GRIBSKOV, M. 2002. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. **Nucleic Acids Res.** 30:149-151.

CHO, M. Y., LEE, H. S., LEE, K. M., HOMMA, Ko-ichi, SHUNJI, N., LEE, B. L. 1999. Molecular cloning and functional properties of two early-stage encapsulation-relating proteins from the coleopteran-insect, *Tenebrio molitor* larvae. **Eur. J. Biochem.** 262:737-744.

CHUNG, H., SZTAL, T., PASRICHA, S., SRIDHAR, M., BATTERHAM, P., DABORN, P. J. 2008. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. **PNAS.** 106:5731-5736.

CONESA, A., GÖTZ, S., GARCÍA-GOMEZ, J. M., TEROL, J., TALÓN, M., ROBLES, M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics.** 21:3674-3676.

COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. 2003. **Bol. SEA.** (Versão Eletrônica 32).

COUTO-FERREIRA, D., MARQUES, R., GUIMARÃES, M. R., NETO, J. R. S., TINÔCO, M. S. 2010. Estudo comportamental das fases de desenvolvimento do *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) da criação científica do Centro de Ecologia e Conservação Anima – ECOA. **Revista da FZVA.** 17:146-158.

DEAN, R. L., LOCKE, M., COLLINS, J. V. 1985. Structure of the fat body. In: Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. 1ª ed. Editores: KERKUT, G. A. e GILBERT, L. I. Pergamon Press, Oxford, Inglaterra. pgs. 155-210.

DERMAUW, W. e LEEUWEN, T. V. 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transporte and resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 45:89-110.

DOW, J. A. T., MADDRELL, S. H. P., GÖRTZ, A., SKAER, N. J. V., BROGAN, S., KAISER, K. 1994. The Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*: a novel phenotype for studies of fluid secretion and its control. **J. Exp. Biol.** 197:421-428.

DOW, J. A.T. e DAVIES, S. -A. The *Drosophila melanogaster* Malpighian tubule. In: Advances in Insect Physiology, 28th. Londres: **Academic Press**, 2001. 1-68.

DOW, J. A. T. e DAVIES, S. -A. 2003. Integrative physiology and functional genomics of epithelial function in a genetic model organism. **Phys. Rev.** 83:687-729.

DOW, J. A. T. e DAVIES, S. A. 2006. The Malpighian tubule: rapid insights from post-genomic biology. **J. Insect Physiol.** 52:365-378.

DOW, J. A. T. 2009. Insights into the Malpighian tubules from functional genomics. **J. Exp. Biol.** 212:435-445.

DUBE, K., MCDONALD, D. G., O'DONNELL, M. J. 2000. Calcium transport by isolated anterior and posterior Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*: roles of sequestration and secretion. **J. Insect Physiol.** 46:1449-1460.

ENAYATI, A. A., RANSON, H., HEMINGWAY, J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Mol. Biol.** 5:3-8.

ESQUIVEL, C. J., CASSONE, B. J., PIERMARINI, P. M. 2016. A *de novo* transcriptome of the Malpighian tubules in non-blood-fed and blood-fed Asian tiger mosquitoes *Aedes albopictus*: insights into diuresis, detoxification, and blood meal processing. **PeerJ.** 4:e1784.

EVENHUIS, N. L. 2006. Catalog of the Keroplatidae of the world (Insecta: Diptera). Bishop Mus Bull Entomol 13. **Bishop Mus Press**, Honolulu.

FRANCKMAN, S., ANHALT, M., NEALSON, K. H. 1990. Cloning, organization, and expression of the bioluminescence genes of *Xenorhabdus luminescens*. **J. Bacteriol.** 172(10):5767.

GAERTNER, L. S., MURRAY, C. L., MORRIS, C. E. 1998. Transepithelial transport of nicotine and vinblastine in isolated Malpighian tubules of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) suggest a P-glycoprotein-like mechanism. **J. Exp. Biol.** 201:2637-2645.

GANFORNINA, M. D., KAYSER, H., SANCHEZ, D. 2013. Lipocalins in Arthropoda: Diversification and Functional Explorations. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): **Landes Bioscience**.

GATENBY, J. B. 1960. The Australian Mycetophilid Glowworms. **Trans. Roy. Soc. New Zeland.** 88:577-593.

GREEN, L. F. B. 1979a. The fine structure of the light organ of the New Zealand glow-worm *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae). **Tissue Cell.** 3:457-465.

GREEN, L. F. B. 1979b. Regional specialization in the Malpighian tubules of the New Zealand glow worm *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae). The structure and function of Type I and II cells. **Tissue Cell.** 4:673-702.

GREEN, K. J. e JONES, J. C. 1996. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. **FASEB J.** 10:871-881.

GRABHERR, M. G., HAAS, B. J., YASSOUR, M., LEVIN, J. Z., THOMPSON, D. A., AMIT, I., ADICONIS, X., FAN, L., RAYCHOWDHURY, R., ZENG, Q., CHEN, Z., MAUCELI, E., HACOEN, N., GNIRKE, A., RHIND, N., DI PALMA, F., BIRREN, B. W., NUSBAUM, C., LINDBLAD-TOH, K., FRIEDMAN, N., REGEV, A. 2011. Full-

length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. **Nat. Biotechnol.** 29:644-52.

GRAHAM, L. A., BENDENA, W. G., WALKER, V. K. 1995. Cloning and baculovirus expression of a desiccation stress gene from the beetle, *Tenebrio molitor*. **Insect Biochem. Molec. Biol.** 26:127-133.

GUPTA, S. K., KUPPER, M., RATZKA, C., FELDHAAR, H., VILCINSKAS, A., GROSS, R., DANDEKAR, T., FÖRSTER, F. 2015. Scrutinizing the immune defence inventory of *Camponotus floridanus* applying total transcriptome sequencing. **BMC Genomics.** 16:540.

GUTIÉRREZ, A. M., HERNÁNDEZ, C. S., WHITEEMBURY, G. 2004. A model for fluid secretion in *Rhodnius* upper Malpighian tubules (UTM). **J. Membr. Biol.** 202:105-114.

HAGAI, T., COHEN, M., BLOCH, G. 2007. Genes encoding putative Takeout/juvenile hormone binding proteins in the honeybee (*Apis mellifera*) and modulation by age and juvenile hormone of the takeout-like gene *GB19811*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 37:689-701.

HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser.** 41:95-98.

HAN, Q., BEERNTSEN, B. T., LI, J. 2007. The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. **J. Insect Physiol.** 53: 254-263.

HASTINGS, J. W. 1983. Biological diversity, chemical mechanisms and evolutionary origins of bioluminescent systems. **J. Mol. Evol.** 19:309-321.

HAUNERLAND, N. H. e BOWERS, W. S. 1986. Aylphorin from the corn earworm *Heliothis zea*. **Insect Biochem.** 16:617-625.

HEINSTRA, P. W. H., GEER, B. W., SEYKENS, D., LANGEVIN, M. 1989. The metabolism of ethanol-derived acetaldehyde by alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) and aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3) in *Drosophila melanogaster* larvae. **Biochem. J.** 259:791-797.

HIGGINS, C. F. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. **Res. Microbiol.** 152:205-210.

HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON, T., THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. 2004. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22:4673-4680.

HOFFMANN, J. A. 2003. The immune response of *Drosophila*. **Nature.** 426:33-38.

HU, Y., GAI, Y., YIN, L., WANG, X., FENG, C., FENG, L., LI, D., JIANG, X-N., WANG, D-C. 2010. Crystal structures of a *Papulus tomentosa* 4-coumarate:CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms. **Plant Cell.** 22:3093-3104.

HWANG, S-J., CHEON, H-M., KIM, H-J., CHAE, K-S., CHUNG, D-H., KIM, M-O., PARK, J-S., SEO, S-J. 2001. cDNA sequence and gene expression of storage protein-2- a juvenile hormone- suppressible hexamerin from the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 129: 97-107.

IZUMI, Y. e FURUSE, M. 2015. Molecular organization and function of invertebrates occluding junctions. **Semin. Cell Dev. Biol.** 36:186-193.

JIANG, Z., WU, X. L., MICHAL, J. J., McNAMARA, J. P. 2005. Pattern profiling and mapping of the fat body transcriptome in *Drosophila melanogaster*. **Obes. Res.** 13:1898-904.

JUEL, C. 2012. Sodium-Proton Exchanger. In: Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease. Editor: MOOREN, F. C. **Springer**, Berlin, Alemanha. pp 797-800.

KING, B. e DENHOLM, B. 2014. Malpighia tubule development in the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). **Arthropod Struct. Dev.** 43: 605-13.

KIKAWADA, T., SAITO, A., KANAMORI, Y., NAKAHARA, Y., IWATA, K-I., TANAKA, D., WATANABE, M., OKUDA, T. 2007. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. **PNAS.** 104:11585-11590.

KIKUTA, S., YUKA, H-K., NODA, H., KIKAWADA, T. 2012. A novel member of the trehalose transporter family functions as an H⁺ - dependent trehalose transporter in the reabsorption of trehalose in Malpighian tubules. **Front. Physiol.** 3:1-9.

KLOWDEN, J. M. In Physiological System in Insects. 2^a ed. United States of America: **Academic Press**, 2007.

KNIGHTS, K. M. e DROGEMULLER, C. J. 2000. Xenobiotic-CoA ligases: kinetic and molecular characterization. **Current Drug Metab.** 1:46-49.

KRUEGER, R. A., BROCE, A. B., HOPKINS, T. L., KRAMER, K. J. 1988. Calcium transport from Malpighian tubules to puparial cuticle of *Musca autumnalis*. **J. Comp. Physiol.** 158:413-419.

LI, X., ZHANG, X., ZHANG, J., ZHANG, X., STARKEY, S. R., ZHU, K. Y. 2009. Identification and characterization of eleven glutathione S-transferase genes from the aquatic midge *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Insect Biochem Mol Biol.** 39:745-754.

LI, Y., PIERMARINI, P. M., ESQUIVEL, C. J., DRUMM, H. E., SCHILKEY, F. D., HANSEN, I. A. 2017. RNA-Seq comparison of larval and adult Malpighian tubules of

the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* reveals life stage-specific changes in renal function. **Front. Physiol.** 8:1-13.

LIU, X., SUN, C., LIU, X., WANG, B., DU, M., AN, S. 2015. Multicopper oxidase-1 is required for iron homeostasis in Malpighian tubules of *Helicoverpa armigera*. **Sci. Rep.** 5:14784.

LOCKE, M. e NICHOL, H. 1992. Iron economy in insects: Transport, metabolism, and storage. **Annu. Rev. Entomol.** 37:195-215.

MADDRELL, S. H. P. e GARDINER, B. O. C. 1976. Excretion of alkaloids by Malpighian tubules of insects. **J. Exp. Biol.** 64:267-281.

MADDRELL, S. H. P. e O'DONELL, M. J. 1992. Insect Malpighian tubules: V-ATPase action in ion and fluid transport. **J. Exp. Biol.** 172:417-429.

MAGGEE, J., KRAYNACK, N., MASSEY, H. C. JR., TELFER, W. H. 1994. Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 25:137-157.

McELROY, W. D. e DeLUCA, M. Chemistry of firefly bioluminescence. In Bioluminescence in Action. **Academic Press**. Nova Iorque. p 109-127, 1978.

McGETTIGAN, J., McLENNAN, R. K. J., BRODERICK, K. E., KEAN, L., ALLAN, A. K., CABRERO, P., REGULSKI, M. R., POLLOCK, V. P., GOULD, G. W., DAVIES, S.-A., DOW, J. A. T. 2005. Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 35:741-754.

MEYER-ROCHOW, V. B. 2007. Glowworms: a review of *Arachnocampa* spp. and kin. **Luminescence.** 22:251-265.

MILLER, S. G. e SILHACEK, D. L. 1993. Properties of two hemolymph riboflavin-binding proteins from *Heliothis virescens*. **Insect Biochem. Molec. Biol.** 23:413-420.

MITCHELL, H. K. e GLASSMAN, E. 1959. Hypoxanthine in rosy and maroon-like mutants of *Drosophila melanogaster*. **Science.** 129:268.

MOFFORD, D. M., REDDY, G. R., MILLER, S. C. 2014. Latent luciferase activity in the fruit fly revealed by synthetic luciferin. **Proc Natl Acad.** 111:4443-4448.

NAPPI, A. J., VASS, E., FREY, F., CARTON, Y. 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. **Nitric oxide.** 4: 423-430

NATION, J. L. In: Insect Physiology and Biochemistry. 3^a ed. Londres: **CRC Press**, 2015.

NICHOL, H. e LOCKE, M. 1990. The localization of ferritin in insects. **Tissue Cell.** 22:767-777.

OBA, Y., BRANHAM, M., FUKATSU, T. 2011. The terrestrial bioluminescent animals of Japan. **Zool. Sci.** 28: 771-789.

ONYENEHO, S. N. e HETTIARACHCHY, N. S. 1992. Antioxidant activity of durum wheat bran. **J. Agric. Food Chem.** 40:1496-1500.

OPPERMANN, U. C. T. e MASER, E. 2000. Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. **Toxicology.** 144, 71-81.

OSAWA, K., SASAKI, T., MEYER-ROCHOW, V. B. 2014. New observations on the biology of *Keroplatus nipponicus* Okada, 1938 (Diptera: Micetophiloidea; Keroplatiade), a bioluminescent fungivorous insect. **Entomologie heute.** 26:139-149.

OVEREND, G., CABRERO, P., HALBERG, K. A., RANFORD-CARTWRIGHT, L. C., WOODS, D. J., DAVIES, S. A., DOW, J. A. 2015. A comprehensive transcriptomic view of renal function in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 67:47-58.

PARK, Y., AIKINS, J., WANG, L. J., BEEMAN, R. W., OPPERT, B., LORD, J. C., BROWN, S. J., LORENZEN, M. D., RICHARDS, S., WEINSTOCK, G. M., GIBBS, R. A. 2008. Analysis of transcriptome data in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 38:380-386.

PEARSON, W. R., WOOD, T., ZHANG, Z., MILLER, W. 1997. Comparison of DNA sequences with protein sequences. **Genomics.** 41:24-36.

PRADO, R. A., SANTOS, C. R., KATO, D. I., MURAKAMI, M. T., VIVIANI, V. R. 2016. The dark and bright sides of an enzyme: a three dimensional structure of the N-terminal domain of *Zophobas morio* luciferase-like enzyme, inferences on the biological function and origin of oxygenase/luciferase activity. **Photochem. Photobiol. Sci.** 15:654-665.

PRAKASH, M. Fat body. In: Insect Biochemistry. 1^a ed. 2008. Nova Déli: **Discovery Publishing House PVT**, 2008.

PRICE, D. P., NAGARAJAN, V., CHURBANOV, A., HOUDE, P., MILLIGAN, B., DRAKE, L. L., GUSTAFSON, J. E., HANSEN, I. A. 2013. The fat body transcriptomes of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*, pre- and post- blood meal. **PLoS ONE.** 6:E22573.

RAFAELI-BERNSTEIN, A. e MORDUE, W. 1978. The transport of the cardiac glycoside ouabain by the Malpighian tubules of *Zonocerus variegatus*. **Physiol. Ent.** 3: 59-63.

RAMBAUT, A., 2007. FigTree: tree figure drawing tool, Version 1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, Universidade de Edimburgo.

RONQUIST, F., TESLENKO, M., van der MARK, P., AYRES, D. L., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M.A., HUELSENBECK, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Syst Biol.** 61:539–542.

RUIZ-SANCHES, E., VAN WALDERVEEN, M., LIVINGSTON, AL., O'DONNELL, M. J. 2007. Transepithelial transport of salicylate by the Malpighian tubules of insects from different orders. **J. Insect Physiol.** 53: 1034-1045.

RUPPERT, E. E; FOX, R. S; BARNES, R. D. Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. Tradução Antonio Carlos Marques. 7º Edição, São Paulo: **Roca**, 2005.

SCHMEIZ, S. e NAISMITH, J. H. 2009. Adenylate-forming enzymes. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 19:666-671.

SCHNEIDER, K., HÖVEL, K., WITZEL, K., HAMBERGER, B., SCHOMBURG, D., KOMBRINK, E., STUIBLE, H-P. 2003. The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase. **PNAS.** 100:8601-8606.

SCHULTE, R. 1996. El manejo de *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) en climas tropicales húmedos. Instituto de la Biología de las amazonia peruana. **Folia Amazônica.** 8:47-76.

SCOTT, J. G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 29:757-777.

SCOTT, J. G. e WEN, Z. 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. **Pest Manag. Sci.** 57:958-9671

SHARPE, M. L., DEARDEN, P. K., GIMENEZ, G., KRAUSE, K. L. 2015. Comparative RNA seq analysis of the New Zealand glowworm *Arachnocampa luminosa* reveals bioluminescence-related genes. **BMC Genomics.** 16:825.

SHEEHAN, D., MEADE, G., FOLEY, V. M., DOWD, C. A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J.** 360:1-16.

SILVA, J. R., PRADO, R. A., AMARAL, D. T., VIVIANI, V. R. 2015a. First transcriptional survey of the Malpighian tubules of giant mealworm, *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Genet. Mol. Res.** 14:464-473.

SILVA, J. R., AMARAL, D. T., J. W. HASTINGS, T. WILSON, VIVIANI, V. R. 2015b. A transcriptional and proteomic survey of *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Keroplatidae) lanterns gives insights into the origin of bioluminescence from the Malpighian tubules in Diptera. **Luminescence.** 30:996-1003.

SOUSA, C. S., SERRÃO, J. E., BONETTI, A. M., AMARAL, I. M. R., KERR, W. E., MARANHÃO, A. Q., UEIRA-VIEIRA, C. 2013. Insights into the *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) fat body transcriptome. **Genet. Mol. Biol.** 36:292-297.

STUIBLE, H. -P., BÜTTNER, D., EHLTING, J., HAHLBROCK, K., KOMBRINK, E. 2000. Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. **FEBS Letters.** 467:117-122.

SUMMERS, K. M., HOWELLS, A. J., PYLIOTIS, N. A. 1982. Biology of eye pigmentation in insects. In: *Advances in Insect Physiology* Vol 16. Londres: **Academic Press**, 1982, pp. 119-166.

SUTHERLAND, T. D., YOUNG, J. H., WEISMAN, S., HAYASHI, C. Y., MERRIT, D. J. 2010. Insect Silk: One name, many materials. **Annu. Rev. Entomol.** 55:171-188.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol. Biol. Evol.** 30, 2725-2729.

TANG, B., WANG, S., ZHANG, F. 2010. Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: Cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival. **BMC Mol. Biol.** 11:65.

TELFER, W. H. e KUNKEL, J. G. 1991. The function and evolution of insect storage hexamers. **Annu. Rev. Entomol.** 36:205-228.

TORRIE, L. S., RADFORD, J. C., SOUTHALL, T. D., KEAN, L., DINSMORE, A. J., DAVIS, S. A, DOW, J. A. T. 2004. Resolution of the insect ouabain paradox. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101: 13689-13693

TROWELL, S. C., DACRES, H., DUMANCIC, M. M., LEITCH, V., RICKARDS, R. W. 2016. Molecular basis for the blue bioluminescence of the Australian glow-worm *Arachnocampa richardsae* (Diptera: Keroplatidae). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 478:533-539.

VIVIANI, V. R. e BECHARA, E. J. H. 1996. Larval *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) fat body extracts catalyze firefly D-luciferin- and ATP-dependent chemiluminescence: A luciferase-like enzyme. **Photochem. Photob.** 63:713-718.

VIVIANI, V. R. 2002. The Origin, Diversity and Structure Function Relationships of Insects Luciferases. **Cell. Mol. Life Sci.** 59:1833-1850.

VIVIANI, V. R., HASTINGS, J. W., WILSON, T. 2002. Two Bioluminescent Diptera: The North American *Orfelia fultoni* and the Australian *Arachnocampa luminosa*. Similar Niche, Different Bioluminescence Systems. **Photochem. Photob.**75:22-27.

VIVIANI, V. R.; PRADO, R. A; ARNOLDI, F. C. G.; ABDALLA, F. C. 2009. An ancestral luciferase in the Malpighian tubules of a non-bioluminescent beetle! **Photochem. Photob.** 8:57-61.

VIVIANI, V. R., CAMARGO, I. A., AMARAL, D. T. 2012. A transcriptional survey of the cDNA library of *Macrolampis* sp2 firefly lanterns (Coleoptera: Lampyridae). **Comp. Biochem. Physiol. Part D**. 8:82-85.

WALMSLEY, S. J. e GAINES, P. J. 2004. Identification of two cDNAs encoding synaptic vesicle protein 2 (SV2)-like proteins from epithelial tissues in the cat flea, *Ctenocephalides felis*. **Insect Mol. Biol.** 13:225-230.

WALSH, A. A., SZKLARZ, G. D., SCOTT, E. E. 2013. Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. **J. Biol. Chem.** 288:12932-12943.

WANG, J., KEAN, L., YANG, J., ALLAN, A. K., DAVIES, S. A., HERZYK, P., DOW, J. A. T. 2004. Function-informed transcriptome analysis of *Drosophila* renal tubules. **Genome Biol.** 5: R69.

WANG, X-W., LUAN, J-B., LI, J-M., BAO, Y-Y., ZHANG, C-X., LIU, S-S. 2010. *De novo* characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. **BMC Genomics.** 11:400.

WATKINS, O. The chemistry of the bioluminescence of the New Zealand Glow-Worm. 2016. Tese de Doutorado em Filosofia. **Universidade de Otago**, Dunedin.

WENG, X.-H., PIERMARINI, P. M., YAMAHIRO, A., YU, M.-J., ANESHANSLEY, D. J., BEYENBACH, K. W. 2008. Gap Junctions in Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. **J. Exp. Biol.** 211:409-422.

WESSING, A., BERTRAM, G., ZIEROLD, K. 1993. Effects of bafilomycin A₁ and amiloride on the apical potassium and proton gradients in *Drosophila* Malpighian tubules studied by X-ray microanalysis and microelectrode measurements. **J. Com. Physiol. Part B**. 163:452-462.

WEIG, A. R. e JAKOB, C. 2000. Functional identification of the glycerol permease activity of *Arabidopsis thaliana* NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in *Saccharomyces cereviase*. **FEBS Lett.** 481:293-298.

WIGGLESWORTH, V. B (ed.) In: The principles of insect physiology. 7a. ed. London: **Chapman and Hall**, 1972.

WIEHART, U. I. M., NICOLSON, S. W., VAN KERKHOVE, E. 2003. The effects of endogenous diuretic and antiduretic peptides and their second messengers in the Malpighian tubules of *Tenebrio molitor*: an electrophysiology study. **J. Insect Physiol.** 49:955-965.

WOOD, K. V. 1995. The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. **Photochem. Photobiol.** 62:662-673.

XIA, Q., CHENG, D., DUAN, J., WANG, G., CHENG, T., ZHA, X., LIU, C., ZHAO, P., DAI, F., HE, N., ZHANG, L., XIANG, Z. 2007. Microarray-based gene expression profiles in multiple tissues of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. **Genome Biol.** 8:R162.

YANOCHKO, G. M. e YOOL, A. J. 2002. Regulated cationic channel function in *Xenopus* oocytes expressing *Drosophila* big brain. **J. Neurosci.** 22:2530-2540.

YE, J., ZHENG, H., ZHANG, Y., CHEN, J., ZHANG, Z., WANG, J., LI, S., LI, R., BOLUND, L., WANG, J. 2006. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. **Nucleic Acids Res.** 34:293-297.

YEATES, D. K., WIEGMANN, B. M., COURTNEY, G. W., MEIER, R., LAMBKIN, C., PAPE, T. 2007. Phylogeny and systematics of Diptera: two decades of progress and prospects. **Zootaxa.** 1668:565-590.

YEPISKOPOSYAN, H., EGLI, D., FERGESTAD, T., SELVARAJ, A., TREIBER, C., MULTHAUP, G., GEORGIEV, O., SCHAFFNER, W. 2006. Transcriptome response to

heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. **Nucleic Acids Res.** 34:4866-4877.

ZHANG, J., ZHANG, Y., LI, J., LIU, M., LIU, Z. 2016. Midgut transcriptome of the cockroach *Periplaneta americana* and its microbiota: digestion, detoxification and oxidative stress response. **PLoS ONE.** 11:E0155254.

ZHONG, X., ZOU, Y., LIU, S-P., YI, Q-Y., HU, C-M., WANG, C., XIA, Q-Y., ZHAO, P. 2013. Proteomic-based insight into Malpighian tubules of silkworm *Bombyx mori*. **PloS One.** 8e75731.

ZHOU, X., TARVER, M. R., BENNETT, G. W., OI, F. M., SCHARF, M. E. 2006. Two hexamerins genes from the termite *Reticulitermes flavipes*: sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. **Gene.** 376:47-58.

10. ANEXO I. Produção científica.

SILVA, J. R., PRADO, R. A., AMARAL, D. T., VIVIANI, V. R. 2015. Transcriptional survey of the Malpighian tubules of *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) giant mealworm. **Genet. Mol. Res.** 14:464-473.

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.January.23.21>

SILVA, J. R., AMARAL, D. T., HASTINGS, J. W., WILSON, T., VIVIANI, V. R. A transcriptional and proteomic survey of *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Keroplatidae) lanterns give insights into the origin of bioluminescence from the Malpighian tubules in Diptera. **Luminescence.** 30:996-1003.

DOI: 10.1002/bio.2850

AMARAL, D. T., OLIVEIRA, G., SILVA, J. R., VIVIANI, V. R. 2016. A new orange emitting luciferase from the Southern-Amazon *Pyrophorus angustus* (Coleoptera: Elateridae) click-beetle: structure and bioluminescence color relationship, evolutionary and ecological considerations. **Photochem. Photobiol.** 15: 1148-1154.

DOI: 10.1039/C6PP00165C

AMARAL, D. T., SILVA, J. R., VIVIANI, V. R. 2017. Transcriptional comparison of the photogenic and non-photogenic tissues of *Phrixothrix hirtus* (Coleoptera: Phengodidae) and non-luminescent *Chauliognathus opacus* (Coleoptera: Cantharidae) give insights on the origin of lanterns in railroad worms. **Gene Reports.** 7:78-86.

DOI: 10.1016/j.genrep.2017.02.004

AMARAL, D. T., SILVA, J. R., VIVIANI, V. R. 2017. Transcriptomes from the photogenic and non-photogenetic tissues and life stages of the *Aspisoma lineatum* firefly (Coleoptera: Lampyridae): Implications for the evolutionary origins of bioluminescence and its associated light organs. **Gene Reports.**

DOI: 10.1016/j.genrep.2017.07.004