

BIOLOGIA EVOLUTIVA DO DESENVOLVIMENTO DE ARTRÓPODES: UMA VISÃO BRASILEIRA

Alessandra da Silva de Alvarenga¹, Felipe Antunes de Oliveira¹, Vitória Tobias-Santos¹, Lupis Gomes Ribeiro Neto¹, Jackson de Souza Menezes¹, Natália Martins-Feitosa¹, Rodrigo Nunes da Fonseca¹

¹Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais – LICM (Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)/ Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Socioambiental de Macaé -NUPEM). UFRJ- Campus Macaé, RJ – BRASIL.

ABSTRACT:

Arthropods are the most diverse in the animal kingdom, and also display a great morphological variability. In Brazil, studies regarding the embryology and evolution of disease vectors or storage pests are scarce. Over the recent years, studies from our group have revealed similarities between the embryonic development of organisms belonging to the phylum Arthropoda, among which stands out the germ band stage. Embryos of different species may display similar morphologies at a certain stage of embryonic development, thus showing evidence that these animal groups have a common evolutionary history. With the development of new technologies and the emergence of EVO-DEVO, it is now possible to investigate the embryogenesis at the genetic level, comparing different taxonomic groups. In this paper, we discuss the importance of including other model organisms besides fruit-fly (*Drosophila melanogaster*) and the studies from our lab which extend the range of arthropod model systems available for developmental studies. These studies include species of medical interest such as the hemiptera *Rhodnius prolixus* and the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) as well as agricultural storage pests, the beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera).

Keywords: *Drosophila melanogaster*; Evo-Devo; Phylotypic stage.

RESUMO:

Os artrópodes possuem o maior número de espécies dentro do reino animal e possuem também uma grande variabilidade morfológica. No Brasil, nosso grupo tem focado em estudar o desenvolvimento embrionário de organismos pertencentes ao filo Arthropoda, particularmente de organismos vetores de doenças ou causadores de grandes prejuízos econômicos, como as pragas de estocagem. Estes estudos têm revelado similaridades e diferenças na biologia do desenvolvimento dos artrópodes. Entre os estágios embrionários conservados encontra-se a banda germinal, que é bastante similar para todo o grupo (estágio filotípico), enquanto que os estágios iniciais, sob influência maternal e os estágios finais da embriogênese, são mais distintos. Estes resultados, junto com demais resultados da literatura, evidenciam uma história evolutiva comum e a constituição de um grupo monofilético dentre os artrópodes. Com o desenvolvimento de novas tecnologias e o surgimento da Biologia Evolutiva do Desenvolvimento (EVO-DEVO), tem sido possível investigar o controle morfogenético do desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, comparando grupos taxonômicos distintos. No presente trabalho discutiremos a importância de ter outros organismos modelo além da mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) para estudos de biologia do desenvolvimento de artrópodes. Estes estudos incluem espécies de interesse médico como o hemiptera *Rhodnius prolixus* e o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) bem como pragas de estocagem, o besouro *Tribolium castaneum* (Coleoptera).

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*; Estágio filotípico; Evo-Devo

INTRODUÇÃO

A imensa diversidade de formas existentes no reino animal tem gerado fascínio entre nós através dos séculos e motivado inúmeras tentativas para estimar a biodiversidade do planeta. Acredita-se que o número total de espécies de insetos esteja entre 2,5 milhões a 10 milhões, embora apenas 1

milhão tenha sido descrito (Grimaldi and Engel, 2005). A teoria da evolução fornece a explicação mais aceita para a origem da diversidade. Charles Darwin (1809-1882) e Alfred Wallace (1823-1913) chegaram a conclusões semelhantes sobre a origem da diversidade por meio da evolução. Para esses naturalistas novas formas de vida surgem a

partir de um tipo ancestral original. Pesquisas com embriologia comparada na segunda metade do século XIX e a genética de populações na primeira metade do século XX, corroboraram grandemente com as conclusões de Darwin e Wallace, tornando a teoria evolutiva robusta e amplamente aceita (revisto em Ridley, 2010).

Dentre os trabalhos com embriologia comparada de maior destaque da segunda metade do século XIX estão aqueles do alemão Ernst Haeckel (1834-1919) e também do germano-brasileiro Fritz Mueller (1822-1897).

Estes trabalhos caracterizaram e compararam os processos embrionários em vertebrados e invertebrados, revelando similaridades entre grupos distintos, tais como o conceito de “estágio filotípico”: embriões de grupos distintos apresentam morfologias semelhantes, característico do grupo taxonômico (daí o termo, “filotípico”). Interessante para o contexto atual, Fritz Mueller utilizou espécies nativas do Brasil em seus estudos de desenvolvimento, em particular os crustáceos em seu completo e instigante livro “Fur Darwin” (Müller, 1864, revisto em Marcellini et al., 2016). As evidências obtidas por Fritz Mueller, Ernst Haeckel, entre outros contemporâneos foram interpretadas como indícios de que estes grupos animais apresentavam história evolutiva comum, e que, portanto, poderiam ser conectados em um tempo remoto a um ancestral comum. O conceito de ancestral comum e da relação filogenética entre as Ordens, Classes e Filos são essenciais para a união entre a biologia evolutiva e a embriologia que tem ocorrido nos últimos 30 anos.

Na década de 1960, o geneticista norte-americano Edward Lewis (1918-2004) estudando a mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) constatou que algumas nasciam com alterações morfológicas, em frequência muito baixa. Na mesma época, o biólogo do

desenvolvimento norte-americano Eric F. Wieschaus e a bióloga alemã Christiane Nüsslein-Volhard iniciaram a produção de mutantes induzidos por agentes químicos desta mosca. Esses pesquisadores conseguiram produzir milhares de moscas mutantes para diferentes genes, de maneira controlada (revisto em Gilbert, 2014). Segundo estes estudos, cada mutação decorria da alteração de apenas um gene. As sequências de DNA dos genes chamados “reguladores mestres”, foram isoladas e manipuladas em laboratório, permitindo detectar o local de ativação do gene no embrião e gerar novos mutantes, que levaram à identificação das bases moleculares do desenvolvimento da *D. melanogaster*, tornando a mosca-da-fruta um dos mais bem caracterizados organismos-modelos (revisto em Marques-Souza et al., 2012). A Evo-Devo surgiu devido a observação de que o complexo de genes Hox estavam presentes na maioria dos organismos e formando um complexo ordenado nos cromossomos.

Vertebrados possuem genes homólogos aos genes de insetos, com funções muito similares. Por exemplo, o gene denominado *eyeless*, de mosca, ativa o desenvolvimento de olhos compostos em insetos; mutantes para esse gene não desenvolvem olhos. A expressão deste gene em outras partes do corpo dá origem a olhos compostos adicionais. Por outro lado, o gene *Pax6*, presente nos embriões de vertebrados, é responsável por formar os olhos simples nestes animais; vertebrados com mutação para o *pax6* resulta em olhos malformados ou mesmo na completa ausência de olhos. A comparação entre as sequências de bases (unidades que formam o DNA) do *eyeless* e do *Pax6* revelou similaridade de sequência entre os dois genes (revisto em Marques-Souza et al., 2012). Os avanços tecnológicos no campo da genética, biologia molecular e celular permitiram a união entre a biologia evolutiva e a embriologia: surge a “Biologia Evolutiva do Desenvolvimento” ou

“Evolutionary Development” (Evo-Devo) (revisto em Marques-Souza et al., 2012).

Os estudos em Evo-Devo avançaram muito nas últimas décadas e têm ajudado na formulação e testes de hipóteses para questões evolutivas antes sem resposta, como aquelas relacionadas à macro evolução, tais como a origem de novos táxons ou os planos corporais. A pesquisa em Evo-Devo tornou possível o acesso a tais questões, pois investiga o controle da biologia do desenvolvimento ao nível genético, comparando grupos taxonômicos distintos. Procura-se principalmente por mudanças nos genes do desenvolvimento associados a alterações evolutivas. Atualmente, para os genes Hox tais associações entre morfologia e genética parecem muito evidentes (Ridley, 2010). Grande parte deste esforço se concentrou no entendimento da embriologia comparada dos artrópodes. (Marques-Souza et al., 2012; Nunes da Fonseca et al., 2012).

Uma característica importante dos estudos de Evo-Devo é a necessidade de comparação dos caracteres estudados ao longo de uma filogenia, isto é, o estudo de Evo-Devo é realizado em várias espécies para se inferir se um determinado caractere é ancestral ou derivado dentre os grupos estudados. Assim, dependendo do caractere fenotípico a ser estudado podem-se realizar estudos com espécies relativamente próximas, isto é cujo ancestral comum viveu a poucos milhares de anos ou com espécies cujos ancestrais comum remontam a períodos bastante distantes como centenas de milhões anos. Um exemplo de estudo de evolução com espécies que divergiram a poucos milhares de anos envolve o surgimento ou perda de pigmentação nas asas de espécies de moscas-da-fruta. Os grupos dos pesquisadores Sean Carroll, Nicolas Gompel e Benjamin Prud'homme tem sido pioneiros neste tipo de estudo (Arnoult et al., 2013; Koshikawa et al., 2015). Estes estudos têm demonstrado que o surgimento de novas regiões pigmentadas nas asas envolve o

aparecimento de novos domínios de expressão genes envolvidos no processo de pigmentação. Estes novos domínios de expressão são mediados por sequências regulatórias presentes em espécies com pigmentação nas asas e ausente nas demais. Dentre as vantagens de se estudar espécies correlatas é a possibilidade muitas vezes de cruzamentos forçados entre espécies e a observação dos híbridos gerados. A similaridade de sequências e a disponibilidade dos genomas destas espécies de moscas-da-fruta também facilitam estes tipos de estudo. Estudos com estas espécies relacionadas também são chamados de estudos de microevolução e encontram-se na fronteira entre a genética de populações e a Evo-Devo.

No outro grupo de estudos da Evo-Devo são realizadas comparações entre grupos mais distantes filogeneticamente, por exemplo, de Ordens ou até mesmo Filos diferentes, cujo ancestral comum dos grupos sendo comparados pode ter vivido a centenas de milhões de anos atrás. Neste tipo de estudo enquadram-se, por exemplo, comparações de funções e estruturas entre diferentes espécies de organismos protostômios, primeira abertura durante a embriogênese dá origem à boca, e deuterostômios, primeira abertura dá origem ao ânus. A partir deste tipo de abordagem comparativa com organismos bastante distantes foi proposto que um mecanismo comum e geral operaria na padronização do eixo dorsoventral em todos os animais com simetria bilateral (revisto em Bier and De Robertis, 2015). Com a diminuição dos custos do sequenciamento de genomas e de transcriptomas, isto é, os RNAs sendo expressos num determinado momento em um tecido ou célula, um crescente número de espécies dos mais variados Filos tem sido estudado. Assim, espécies raras, de difícil cultivo ou acesso vem sendo estabelecidas como modelos de estudo de biologia evolutiva do desenvolvimento.

Por último uma área de intensa investigação nos últimos anos é a chamada Eco-Evo-Devo, isto é a integração de componentes do meio ambiente aos processos de biologia do desenvolvimento. Vários exemplos de plasticidade fenotípica, ou seja, diferentes respostas em um mesmo genótipo tem trazido componentes até então ignorados para a discussão dos processos de desenvolvimento (Gilbert et al., 2015), incluindo, por exemplo, estudos de como a presença de simbioses pode modular o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário de diversos organismos.

A investigação de organismos não-modelos tem revelado, como esperado, muitas similaridades entre o desenvolvimento embrionário de artrópodes, dentre as quais destaca-se o estágio de banda germinal, que apresenta forma típica para o grupo (estágio filotípico) (Figura 1). Estudos têm demonstrado também divergências flagrantes na forma e no funcionamento dos organismos deste grupo, sobretudo nos estágios de ovo e adultos. Tais similaridades e divergências revelam a imensa variedade de tipos de controle genético dentre os artrópodes, particularmente nos estágios iniciais e bem tardios do desenvolvimento embrionário, perto da eclosão. Assim, parece importante o levantamento de dados sobre a biologia do desenvolvimento de organismos não-modelo, a fim de determinar padrões morfológicos diversos e estabelecer novos modelos experimentais (Marques-Souza et al., 2012).

Muitos dos organismos não-modelo atualmente em início de estudo no Brasil são vetores de doenças tropicais, historicamente marginalizadas pela ciência. Além disso, muitos são considerados pragas às atividades humanas, como culturas, criações e estocagem de alimentos, gerando milhões de dólares de prejuízo todos os anos. Entender melhor a embriologia destes organismos nos ajudará a controlar suas populações. Isto mostra como pode ser importante, do ponto de vista

ambiental e estratégico do país, o estudo de organismos não-modelo próprios, bem como a aplicação deste conhecimento (Nunes da Fonseca et al., 2012).

Este trabalho consiste numa revisão das contribuições em Evo-Devo fornecidas pela pesquisa em biologia evolutiva do desenvolvimento (EVO-DEVO) desenvolvidas por um grupo de pesquisadores do Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais do Núcleo de Pesquisas em Ecologia e Desenvolvimento Socioambiental da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Esta revisão ilustra o quão importante pode ser o estudo da biologia do desenvolvimento comparada de organismos não-modelos no filo Arthropoda, seja no que se refere a um melhor entendimento desta etapa fundamental na vida deste filo animal, no fornecimento de ferramentas metodológicas para o controle de pragas e vetores de doenças subvalorizadas pela ciência.

Evo-devo em artrópodes

Os artrópodes representam o grupo mais numeroso do reino animal, compreendendo três quartos das espécies descritas, apresentando ampla diversidade de formas e de estratégias evolutivas (Jacobs et al., 2013). Devido ao esqueleto externo e rígido, a história evolutiva dos diferentes grupos está bem documentada no registro fóssil. Ao documentário fóssil veio se somar as modernas ferramentas genéticas (tais como a tecnologia do DNA recombinante, clonagem, mutações induzidas e silenciamento gênico), o que tornou possível fazer inferências sobre a história evolutiva do grupo. Assim, o estudo dos artrópodes tem nos ajudado a compreender melhor os mecanismos relacionados a sua diversidade (Grimaldi and Engel, 2005).

Recentes análises filogenômicas, isto é, utilizando um grande número de genes presentes nos genomas de artrópodes, indicam que insetos e crustáceos formam o grupo

Tetrachonata (Pan-crustacea). Segundo estes estudos a origem dos insetos datam do Ordoviciano, aproximadamente 479 milhões de anos atrás e de insetos com asas a 406 milhões de anos atrás (Misof et al., 2014).

Dentre as principais adaptações dos insetos se comparados com seu grupo irmão, os crustáceos, encontram-se o surgimento de estruturas especializadas para a reprodução, os ovários contendo diferentes ovaríolos e a presença de uma simetria bilateral evidente já durante o processo de ovogênese (Lynch et al., 2010), uma característica exclusiva deste grupo de animais. Em outras palavras, na maior parte dos insetos é possível identificar as regiões anteriores e posteriores dos ovos bem como as regiões dorsais e ventrais ainda quando os ovócitos se encontram no abdome de suas mães. Outras características importantes dos insetos, particularmente dos Pterygota (insetos com asa), é a presença de uma membrana protetora e envoltória nos ovos, a serosa. Recentes estudos demonstraram que esta membrana é fundamental para a resistência a dissecação e sobrevivência em situações com um ambiente desfavorável (Jacobs et al., 2013).

A serosa encontra-se presente na maior parte dos insetos com exceção de um grupo de Diptera derivado (Schizophora), que inclui a mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster* (INSECTA: Diptera). Este Diptera é o organismo-modelo mais usado para estudos em Genética e Evolução entre os artrópodes. Um bom organismo-modelo deve apresentar facilidade e baixo custo de manutenção; ciclo de vida curto; possibilidade de realização de screenings genéticos de maneira rápida; além disso, *D. melanogaster* apresenta a possibilidade de produção e manutenção de mutantes por infinitas gerações devido à presença de cromossomos balanceadores e o maior número de ferramentas genéticas, genômicas e de biologia molecular e celular já desenvolvidas para um organismo multicelular.

Todas estas características fazem da mosca da fruta um organismo-modelo ideal para a abordagem das questões da biologia a medicina.

A definição dos eixos antero-posterior (AP) e dorso-ventral (DV) em embriões de artrópodes ocorre durante o desenvolvimento embrionário e é fundamental para a correta alocação dos futuros órgãos e segmentos dos insetos adultos (da Fonseca et al., 2009; Lynch et al., 2010). Foi confirmada a participação de vários genes no estabelecimento dos eixos AP e DV ao longo da ovogênese e embriogênese de insetos de banda longa, entre eles os mensageiros maternos bicoid e nanos. Estes dois mensageiros são responsáveis por diferenciar as regiões anterior e posterior do embrião, respectivamente. Em *Drosophila* o gene bicoid atua como fator de transcrição para mais de dez genes zigóticos. Por outro lado, nanos não funciona como um regulador da transcrição, mas sim como um repressor da tradução do gene hunchback, na região posterior, estabelecendo gradiente desta última ao longo do eixo AP (revisto em Nunes da Fonseca et al., 2012). Vários estudos realizados ao longo dos últimos anos particularmente pelo pesquisador da Universidade de Chicago Urs Schmidt-Ott demonstraram que o gene bicoid é uma novidade evolutiva dos dípteros derivados. Outros insetos e vertebrados utilizam um outro gene com um domínio homeobox similar a bicoid denominado orthodenticle (revisto em Schmidt-Ott and Lynch, 2016).

Por outro lado, a diferenciação das regiões dorsal e ventral decorre da expressão/inibição de outro gene materno (dorsal), o qual depende da expressão de outro gene materno, o seu receptor (Toll). O efeito de dorsal consiste em entrar no núcleo, causando a ativação de genes ventralizantes e repressão de genes com efeito dorsalizante. O resultado da expressão de dorsal é a especificação em células da região ventral. No

entanto, a internalização de dorsal apenas acontece nas células marcadas com a proteína de membrana Toll. O silenciamento do gene dorsal causa a dorsalização de todas as células do embrião de *D. melanogaster* (revisto em Nunes da Fonseca et al., 2012).

Concluiu-se que apesar de todas as vantagens, *D. melanogaster* é um inseto com diversas características derivadas em relação a outros grupos de insetos. O desenvolvimento embrionário inicia-se ainda no corpo da fêmea, após o ovócito ter sido fertilizado. Em seguida, ocorrem séries cíclicas de divisões nucleares extremamente rápidas, denominadas clivagens. Em aproximadamente 1 hora, um ovócito fecundado com um único núcleo passa a apresentar 256 núcleos. Esses núcleos ocupam a periferia do ovo. As divisões tornam-se progressivamente mais lentas e então ocorre a celularização: núcleos recém-formados são individualizados por membranas. O resultado é uma camada simples de células que envolve o vitelo central. As divisões celulares continuam e, aproximadamente 4 horas após a fertilização, o embrião possui cerca de 6000 células (revisto em Hartenstein and Chipman, 2015). Esta etapa também marca a transição materno-zigótica: os RNAs mensageiros de origem materna são degradados e, ao mesmo tempo, intensificam-se as transcrições de genes a partir do genoma do zigoto. Assim, a transição materno-zigótica marca o fim da dependência dos genes maternos no controle do desenvolvimento embrionário, com o genoma do embrião assumindo seu próprio desenvolvimento. O processo faz todo sentido: conforme o número de células aumenta, a atividade genética do organismo fica mais acelerada. As células começam então a se movimentar: tem início a gastrulação, em que o embrião define os destinos dos grupos celulares. Células da periferia migram para o interior, através de processo de invaginação celular. A gastrulação resulta num embrião com várias camadas germinativas ou folhetos

embrionários, a partir de uma camada única de células. As células então se realocam formando a banda germinal (revisto em Hartenstein and Chipman, 2015). O estágio de banda germinal observado em *D. melanogaster* pode ser considerado a versão, nos artrópodes, do estágio filotípico verificado nos vertebrados (FIGURA 1).

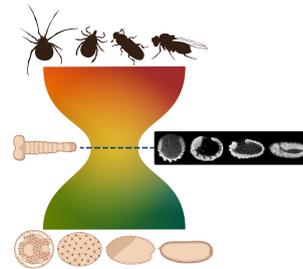


Figura 1 – Modelo da ampulheta. Adaptado a partir de várias fontes incluindo estudos de Ernst Haeckel e mais recentemente a partir de estudos do embriologista alemão Klaus Sander. Na parte de baixo da figura são representados ovos de diversos artrópodes. Nota-se que a morfologia e organização celular é bastante diferente entre os grupos nos estágios iniciais do desenvolvimento. No painel do meio da ampulheta encontra-se o estágio de banda germinal onde todos os artrópodes demonstrados apresentam segmentação evidente e forma similar, a partir de marcação nuclear (lado direito). Na parte superior da ampulheta são demonstrados quatro dos principais organismos apresentados no artigo o díptero *Drosophila melanogaster*, o coleóptero *Tribolium castaneum*, o carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) e a aranha *Parasteatoda tepidariorum* (Ilustração Vitória Tobias-Santos).

Apesar do vasto conhecimento sobre o controle genético da embriogênese em *D. melanogaster*, o padrão de desenvolvimento deste artrópode é do tipo “banda germinal longa”, característica derivada entre artrópodes. Se por um lado, este modelo de desenvolvimento não é o mais representado entre as diferentes ordens de artrópodes, por outro é o mais comum nas ordens mais numerosas de insetos como Diptera e Hymenoptera por exemplo. Assim, acredita-se numa entre duas hipóteses: ou a característica banda germinal longa foi perdida na maior parte das ordens ao longo da história evolutiva do grupo; ou ela teria aparecido independentemente, diversas vezes ao longo da evolução dentro das quatro maiores ordens de insetos – Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera. (Davis and Patel, 2002). Por outro lado, insetos com “banda germinal curta” e “banda germinal intermediária” estão

amplamente representados nas várias ordens. Seu desenvolvimento é mais lento, pois nestes últimos existe uma separação temporal entre a formação das regiões anterior e posterior do corpo. Em insetos, as características banda germinal curta e intermediária são consideradas primitivas. O besouro da farinha *Tribolium castaneum* e o barbeiro *Rhodnius prolixus* são exemplos de organismos com estes tipos de desenvolvimento (Nunes da Fonseca et al., 2017; Nunes da Fonseca et al., 2012). Nestes insetos, os segmentos localizados na região anterior formam-se inicialmente, durante o estágio de blastoderma e os segmentos posteriores formam-se depois, sequencialmente, a partir de uma zona de crescimento (Davis and Patel, 2002). Além destas características outros processos de desenvolvimento foram bastante modificados ao longo da evolução dos insetos. Além da formação da zona de crescimento ser uma característica ancestral nos artrópodes, a presença e a formação de membranas extraembrionárias durante a embriogênese, a formação de pernas durante o desenvolvimento embrionário, a presença de estruturas complexas durante a formação da cabeça na embriogênese são características presentes em diversos embriões de artrópodes e que foram perdidas na evolução dos dípteros derivados como *D. melanogaster* (El-Sherif et al., 2012; Kittelmann et al., 2013; Panfilio et al., 2013).

Incrivelmente, o controle genético de eventos tão distintos como os apresentados acima, envolve os mesmos genes reguladores. Um exemplo está no conjunto de genes chamados “Pair-rules genes”. Insetos de banda longa, como *D. melanogaster*, integram as informações sobre a posição dos segmentos corporais (pela gradação de fatores de transcrição ao longo do corpo) com os sinais para a polarização destes segmentos por meio da ação de “Pair rules genes”. A diferença está que enquanto em *D. melanogaster*, esta integração ocorre em ambiente sincicial, isto é,

sem células, no besouro da farinha (*Tribolium castaneum*), um inseto de banda curta, evento semelhante ocorre em ambiente celularizado (Davis and Patel, 2002). Embriões de quelicerados, como aranhas e carrapatos dentre outros grupos de artrópodes, também apresentam modelo de desenvolvimento de banda germinal curta (Hilbrant et al., 2012; Santos et al., 2013). O estudo filogenético dos artrópodes grupo coloca os quelicerados numa posição basal, isto é com uma separação prematura, em relação aos demais artrópodes (Regier et al., 2010). Em aranhas, os quelicerados mais bem estudados em relação a embriogênese, por exemplo, não há estágio larval: os embriões eclodem dos ovos como pequenos adultos, de modo semelhante aos insetos ametábolos. Assim, o estudo em Evo-Devo pode ajudar no entendimento da evolução do desenvolvimento embrionário em artrópodes (Hilbrant et al., 2012). Deste modo, estudos comparativos do desenvolvimento embriológico envolvendo artrópodes semelhantes e diferentes entre si, com características primitivas e derivadas parece contribuir no entendimento da evolução do desenvolvimento deste grupo.

Estudos morfogenéticos: Contribuições do Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais e colaboradores em organismos não-modelo

Estabelecimento de um novo modelo para quelicerados: o carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae)

Nos últimos anos, estudos moleculares experimentais examinaram a embriologia de aranhas, quelicerados; em particular a aranha comum de casa (common house spider), *Parasteatoda tepidariorum*. Para um excelente resumo dos estudos de Evo-Devo em quelicerados sugere-se ao leitor se dirigir para Schwager et al., 2015. No entanto, estudos de biologia evolutiva do desenvolvimento de

biologia evolutiva do desenvolvimento de outros grupos de quelicerados, tais como os carrapatos (Acari: Parasitiformes), são bastante escassos. Os carrapatos são bem conhecidos por sua prática alimentar sanguínea e por serem vetores de várias doenças (Santos et al., 2013). Com intuito de conhecer um pouco mais sobre a embriogênese dos carrapatos foi realizado um estudo para analisar o desenvolvimento embrionário do carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer métodos básicos para o estudo de Evo-Devo em um modelo quelicerado e representante do grupo dos Parasitiformes, até então pouco estudado em termos de desenvolvimento embrionário. Primeiramente desenvolvemos um sistema de estágios embrionários composto por 14 estágios, que podem ser diferenciados fenotipicamente por diferenças morfológicas simples, como presença e aumento do número de células ou estruturas a partir de marcação nuclear simples por um intercalante de DNA. Além disso foram realizadas análises histológicas simples e marcações utilizando anticorpos conservados para genes com homeobox, os chamados genes Hox, bem como anticorpos contra proteínas sabidamente envolvidas na sinalização intercelular como a proteína Toll e o efetor da via de Bone Morphogenetic Protein (BMP), denominado de MAD fosforilada (pMad).

Quais foram as principais conclusões destas análises publicadas por Santos et al., 2013? A primeira é que embriões de carrapato são de banda curta, ou seja, geram seus segmentos anteriores (prosomais) num primeiro momento e num segundo momento os segmentos posteriores (opistosomais). Somente no final da embriogênese os segmentos posteriores do embrião de carrapato se fusionam, formando o aspecto morfológico característico do grupo, uma fusão completa dos segmentos, num corpo único. Além disso

quatro pares de pernas são formadas durante o processo de embriogênese no carrapato e o último par regride ao final da embriogênese. A ninfa (larva) de carrapato eclode somente com três pares de pernas. A segunda conclusão é que embriões de carrapato, assim foi demonstrado para embriões de aranha (revisado em Schwager et al., 2015), apresentam uma população de células com capacidade migratória que estabelece a padronização dorsoventral, essas células são denominadas de cumulus. Assim como em embriões de aranha as células do cumulus possuem atividade da via de sinalização de BMP. Por último foi identificada a presença de uma linha média ventral que regride ao longo da embriogênese.

A conclusão deste trabalho foi muito importante para o campo da Evo-Devo. A partir destas informações relevantes quanto ao desenvolvimento embrionário dos carrapatos podem ser feitas inferências acerca de sua filogenia. As características estudadas sugerem que pelo menos em termos embriológicos ácaros e carrapatos não constituem um grupo monofilético. Este estudo ainda foi essencial para o estabelecimento como um novo modelo para quelicerados. Uma pergunta bastante interessante e que permanece aberta mesmo após este estudo se relaciona a uma possível pré-padronização do eixo ântero-posterior em embriões de carrapatos se comparado com demais quelicerados. Esta antecipação de simetria bilateral é observada em insetos, particularmente nas ordens mais derivadas como os dípteras. Pelo menos em termos de sinalizações conservadas a via de EGF atua no ovário de carrapato durante o processo de crescimento dos ovócitos em desenvolvimento de forma pelo menos análoga ao observado em insetos (Lynch et al., 2010, Tobias-Santos et al., dados não publicados).

O gene zelda e seu papel embrionário e pós-embrionário no besouro modelo Tribolium castaneum.

A ovogênese é uma fase que ocorre no desenvolvimento de todos os animais e nesta ocorre o depósito de produtos de genes maternos no ovócito em desenvolvimento, que regulam os processos iniciais do desenvolvimento embrionário. O genoma zigótico recebe o controle do desenvolvimento embrionário logo após os estágios iniciais do desenvolvimento, em um processo conhecido como transição materno zigótica (MZT). Geralmente em *Drosophila melanogaster*, a MZT ocorre após a fertilização e o principal fator de transcrição envolvido neste processo denomina-se Zelda. Zelda está envolvido na ativação de centenas de alvos importantes para diversos processos biológicos fundamentais para a embriogênese como a celularização, determinação sexual, neurogênese e padronização dos eixos (Liang et al., 2008).

Assim, nosso grupo junto com colaboradores (Prof. Thiago Venâncio-UENF) iniciamos buscas para identificar genes similares a zelda em outros genomas de artrópodes e uma análise funcional detalhada em um modelo de embriogênese banda curta, ou seja, um modelo de embriogênese típico de insetos ancestrais. Assim, escolhemos o coleóptera praga de estocagem, *Tribolium castaneum*, afim de realizar a primeira caracterização do gene zelda (*zld*) em um modelo de banda curta. Nossos resultados demonstraram uma expressão de zelda tanto maternal quanto na zona de crescimento, região posterior e característica do embrião de banda curta. A partir desta e de outras análises mais detalhadas de genes-alvo conservados em *D. melanogaster* e *T. castaneum* propusemos um modelo em que zelda é um fator de transcrição fundamental para manutenção das células embrionárias num estado indiferenciado e proliferativo tanto na zona de crescimento quanto nos estágios iniciais do desenvolvimento. No momento nosso grupo está envolvido na caracterização da função de zelda em estágios pós-embrionários, larva,

pupa e adultos (Ribeiro et al., dados não publicados).

Evolução das vias de sinalização envolvidas na formação do eixo dorsoventral em artrópodes: O papel da via de sinalização Toll no desenvolvimento de Rhodnius prolixus.

O inseto hemimetábolo *Rhodnius prolixus* é um importante vetor da doença de Chagas nas Américas e um clássico modelo para o estudo de fisiologia de artrópodes. Todavia estudos de biologia evolutiva do desenvolvimento em *R. prolixus* têm sido negligenciados ao longo dos anos. *R. prolixus* apresenta embrião do tipo banda germinal curta, e assim como o besouro *T. castaneum* descrito acima forma uma de zona de crescimento posterior. Possui, além disso, movimentos complexos durante sua katatrepsis, uma inversão com migração do embrião ao longo do eixo do ovo, não observados em outras ordens de insetos holometábolos (Panfilio & Roth, 2010). No entanto, muito pouco se sabe sobre os eventos morfológicos e moleculares que regulam sua embriogênese com notáveis exceções de alguns artigos clássicos na década 1930 (revisto em Nunes da Fonseca et al., 2017) e artigos recentes de um outro grupo latino-americano (Lavore et al., 2014; Lavore et al., 2012; Lavore et al., 2015).

Para o estudo da evolução da padronização do eixo dorsoventral em artrópodes *R. prolixus*, como um inseto hemimetábolo se encontra numa posição importante filogeneticamente. Quelicerados como a aranha *P. tepidariorum* e diversos outros grupos com simetria bilateral utilizam a via de sinalização de BMP para padronizar todo o seu eixo dorsoventral. Ao contrário, dípteros derivados como *D. melanogaster* utilizam majoritariamente a via de Toll, com exceção de uma contribuição importante, todavia menor da via de BMP (Araujo et al.,

, 2011; da Fonseca et al., 2009; da Fonseca et al., 2008; Nunes da Fonseca et al., 2012). A hipótese proposta por Siegfried Roth e colaboradores na Alemanha é que Toll teria inicialmente uma função na imunidade nos ovos e adultos de artrópodes, sendo esta função co-optada (aproveitada) secundariamente para a padronização do eixo dorsoventral em insetos. Para validar ou refutar esta hipótese são necessários estudos em espécies representantes de grupos cujo ancestral comum com os holometábolos (dípteros e coleópteros, por exemplo), viveu a centenas de milhões de anos

Assim foi iniciado um estudo por nosso grupo junto com o grupo da Profa. Helena Araujo (UFRJ-ICB) visando responder se o inseto hemimetábolo *R. prolixus* se utilizaria majoritariamente da via de Toll ou da via de BMP para padronização de seu eixo dorsoventral. Para isto Berni et al., 2014 demonstraram que a via de Toll é fundamental para a padronização dorsoventral neste inseto e estes dados foram corroborados por uma análise funcional bastante completa em outro hemíptero, o fitófago *Oncopeltus fasciatus* (Sachs et al., 2015). Assim, embora nossos estudos para avaliar a contribuição de cada via de sinalização (BMP e Toll) ainda estejam em andamento, nossos dados sugerem que ambas vias são utilizadas em hemípteros, logo nossos estudos futuros focarão em grupos ainda mais basais na árvore filogenética dos insetos incluindo grupos na base dos Hexapoda.

*A formação do sistema digestivo em artrópodes:
Estudo da expressão e da função gênica na aranha
Parasteatoda tepidariorum*

Uma das mais importantes questões envolvendo a biologia evolutiva dos artrópodes, em particular dos quelicerados, é a origem do sistema digestório nestes animais (Schwager et al., 2015). Em insetos com

simetria bilateral como *D. melanogaster* as regiões anteriores e posteriores do ovo são facilmente identificadas e estabelecidas maternamente a partir da ação do chamado sistema terminal. Estas regiões darão origem a futura boca e ao ânus. Ambas extremidades são derivadas do estomodeo e do proctodeo e são originárias do ectoderma. A região do intestino médio, por outro lado, tem origem do endoderma e estudos para entender a origem do tubo digestório em artrópodes são bastante escassos. Assim Feitosa et al., 2017 realizou um estudo temporal detalhado da expressão molecular dos genes envolvidos com a padronização do sistema digestório na aranha modelo *P. tepidariorum*. Este trabalho foi bastante facilitado pela recém-publicação do genoma desta aranha (Schwager et al., 2017). Este estudo demonstrou que moléculas sinalizadoras do tipo Wnt e Hh são expressos e provavelmente envolvidos na padronização dos componentes ectodermis do tubo digestório em desenvolvimento. Famílias de fatores de transcrição do tipo GATA e dos receptores nucleares de ação hormonal HNF-4 são expressos em células grandes conhecidas como vitelofagos, sendo possível que estas últimas células constituam o intestino médio desta aranha. Por último a diminuição da expressão, a partir da técnica de RNA de interferência, para o fator de transcrição forkhead levou a perda de células do endoderma e do mesoderma, sugerindo a existência de um precursor bipotente endomesodermal nestes quelicerados. Assim, embora este estudo sugira um papel destas células conhecidas como vitelofagos na formação do intestino médio somente estudos mais detalhados de destinos celulares envolvendo injeções de traçadores celulares (fate mapping) poderão determinar a origem real do tubo digestório em quelicerados e em outros artrópodes.

O estudo de pequenas sequências abertas de

leitura (smORFs) em artrópodes

Em eucariotos os processos de transcrição e tradução ocorrem no núcleo e no citoplasma, respectivamente. É universalmente aceito que proteínas são traduzidas a partir de um único RNA mensageiro, os chamados RNAs monocistrônicos, ou seja com uma única origem de tradução ou um único códon de iniciação o AUG, que codifica o amino ácido metionina. Nos últimos anos esse dogma de que um RNA mensageiro codifica um único peptídeo começou a ser questionado a partir de evidências experimentais em insetos. Savard et al., 2006 estudando a padronização axial no besouro da farinha *T. castaneum* demonstrou a existência de um gene que em sua sequência codifica quatro peptídeos possivelmente funcionais. A perda de função deste gene a partir de RNA de interferência gerou larvas de besouros com até seis pares de pernas ao contrário de indivíduos selvagens que como os demais hexápodos possuem três pares. Este gene foi denominado de mille-pattes (mlpt), muitas patas em francês, e se tornou o primeiro exemplo de um gene policistrônico importante para o desenvolvimento embrionário em insetos. Análises do ortólogo (gene correspondente) em *D. melanogaster* demonstrou características conservadas e divergentes entre o papel desse gene em besouros e moscas-da-fruta (Galindo et al., 2007). Estudos subsequentes de genômica funcional e bioinformática demonstraram a existência de centenas possíveis genes policistrônicos em mosca-da-fruta (Ladoukakis et al., 2011). Assim, nosso laboratório iniciou a análise funcional do ortólogo de mlpt no hemíptero *R. prolixus* e no mosquito vetor da dengue *Ae. aegypti* (Albuquerque et al., 2015, Tobias-Santos et al, dados não publicados). Nossos resultados indicam que este gene não é requerido somente durante a embriogênese mas também em processos pós-embrionários como na metamorfose larvar, incluindo um

papel na formação e estabelecimento das estruturas mais distais das pernas, o tarso, durante o processo de desenvolvimento dos membros. No momento, nossas buscas a partir de dados de transcriptoma tem visado identificar genes com características similares a pequenas open reading frames ORFs (smORFs) altamente expressos durante o desenvolvimento embrionário. Esperamos no futuro estudar a função destes candidatos através de análises funcionais como hibridizações in situ e RNA de interferência.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nos últimos anos espécies de artrópodes não-modelo e não exploradas foram adicionadas a estudos de Evo-Devo no Brasil, particularmente devido a contribuição de nosso grupo e de colaboradores. O estudo de um maior número de espécies de diferentes grupos taxonômicos permitirá inferir se uma determinada característica observada é comum ao grupo de artrópodes estudado ou uma novidade evolutiva de um determinado grupo. A experiência adquirida pelo grupo em estudar diversos organismos em diferentes contextos filogenéticos é importante inclusive por razões econômicas e até mesmo de saúde pública. Nossos estudos utilizando o besouro *Tribolium castaneum* uma praga de estocagem e os artrópodes vetores como o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a doença de Chagas (*Rhodnius prolixus*) e o mosquito *Aedes aegypti* vetor da dengue, chikungunya e mais recentemente o Zika vírus colocam nosso grupo na vanguarda do conhecimento mundial no estudo da embriogênese destes grupos. Com o surgimento de novas tecnologias envolvendo propagação de construções de DNA recombinantes capazes de facilitar este tipo de estudo (Barrangou and Doudna, 2016; Gantz and Bier, 2015), o principal fator limitante para o progresso de nossas pesquisas é o escasso financiamento público da pesquisa no

da pesquisa no Brasil. Esta escassez de recursos tem levado a saída dos estudantes formados em nosso grupo para instituições no exterior onde os mesmos colaboram com o progresso da ciência em outros países. Espera-se uma modificação no financiamento da pesquisa básica em vetores e pragas agrícolas para nos próximos anos para desvendarmos, pelo menos em parte, os segredos da biologia do desenvolvimento do filo mais bem-sucedido do Reino Animal, os artrópodes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, J.P., Tobias-Santos, V., Rodrigues, A.C., Mury, F.B., Fonseca, R.N.d., 2015. small ORFs: A new class of essential genes for development. *Genetics and molecular biology* 38, 278-283.
- Araujo, H., Fontenele, M.R., da Fonseca, R.N., 2011. Position matters: variability in the spatial pattern of BMP modulators generates functional diversity. *genesis* 49, 698-718.
- Arnoult, L., Su, K.F., Manoel, D., Minervino, C., Magrina, J., Gompel, N., Prud'homme, B., 2013. Emergence and diversification of fly pigmentation through evolution of a gene regulatory module. *Science* 339, 1423-1426.
- Barrangou, R., Doudna, J.A., 2016. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol* 34, 933-941.
- Berni, M., Fontenele, M.R., Tobias-Santos, V., Caceres-Rodrigues, A., Mury, F.B., Vionette-do-Amaral, R., Masuda, H., Sorgine, M., da Fonseca, R.N., Araujo, H., 2014. Toll signals regulate dorsal-ventral patterning and anterior-posterior placement of the embryo in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *EvoDevo* 5, 38.
- Bier, E., De Robertis, E.M., 2015. EMBRYO DEVELOPMENT. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science* 348, aaa5838.
- da Fonseca, R.N., Lynch, J.A., Roth, S., 2009. Evolution of axis formation: mRNA localization, regulatory circuits and posterior specification in non-model arthropods. *Current opinion in genetics & development* 19, 404-411.
- da Fonseca, R.N., von Levetzow, C., Kalscheuer, P., Basal, A., van der Zee, M., Roth, S., 2008. Self-regulatory circuits in dorsoventral axis formation of the short-germ beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental cell* 14, 605-615.
- Davis, G.K., Patel, N.H., 2002. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu Rev Entomol* 47, 669-699.
- El-Sherif, E., Averof, M., Brown, S.J., 2012. A segmentation clock operating in blastoderm and germband stages of *Tribolium* development. *Development* 139, 4341-4346.
- Feitosa, N.M., Pechmann, M., Schwager, E., Tobias-Santos, V.M., Alistair; Damen, Wim; Nunes da Fonseca, R., 2017. Molecular control of gut formation in the spider *Parasteatoda tepidariorum*. submitted.
- Galindo, M.I., Pueyo, J.I., Fouix, S., Bishop, S.A., Couso, J.P., 2007. Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS biology* 5, e106.
- Gantz, V.M., Bier, E., 2015. Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 348, 442-444.

- Gilbert, S.F., 2014. *Developmental Biology*. Sinauer.
- Gilbert, S.F., Bosch, T.C., Ledon-Rettig, C., 2015. Eco-Evo-Devo: developmental symbiosis and developmental plasticity as evolutionary agents. *Nat Rev Genet* 16, 611-622.
- Grimaldi, D., Engel, M.S., 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
- Hartenstein, V., Chipman, A.D., 2015. Hexapoda: A *Drosophila*'s View of Development, in: Wanninger, A. (Ed.), *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates* 5.
- Hilbrant, M., Damen, W.G., McGregor, A.P., 2012. Evolutionary crossroads in developmental biology: the spider Parasteatoda tepidariorum. *Development* 139, 2655-2662.
- Jacobs, C.G., Rezende, G.L., Lamers, G.E., van der Zee, M., 2013. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proc Biol Sci* 280, 20131082.
- Kittlmann, S., Ulrich, J., Posnien, N., Bucher, G., 2013. Changes in anterior head patterning underlie the evolution of long germ embryogenesis. *Dev Biol* 374, 174-184.
- Koshikawa, S., Giorgianni, M.W., Vaccaro, K., Kassner, V.A., Yoder, J.H., Werner, T., Carroll, S.B., 2015. Gain of cis-regulatory activities underlies novel domains of wingless gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 7524-7529.
- Ladoukakis, E., Pereira, V., Magny, E.G., Eyre-Walker, A., Couso, J.P., 2011. Hundreds of putatively functional small open reading frames in *Drosophila*. *Genome biology* 12, R118.
- Lavore, A., Esponda-Behrens, N., Pagola, L., Rivera-Pomar, R., 2014. The gap gene Kruppel of *Rhodnius prolixus* is required for segmentation and for repression of the homeotic gene *sex comb-reduced*. *Dev Biol* 387, 121-129.
- Lavore, A., Pagola, L., Esponda-Behrens, N., Rivera-Pomar, R., 2012. The gap gene giant of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation. *Dev Biol* 361, 147-155.
- Lavore, A., Pascual, A., Salinas, F.M., Esponda-Behrens, N., Martinez-Barnette, J., Rodriguez, M., Rivera-Pomar, R., 2015. Comparative analysis of zygotic developmental genes in *Rhodnius prolixus* genome shows conserved features on the tracheal developmental pathway. *Insect Biochem Mol Biol* 64, 32-43.
- Liang, H.L., Nien, C.Y., Liu, H.Y., Metzstein, M.M., Kirov, N., Rushlow, C., 2008. The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. *Nature* 456, 400-403.
- Lynch, J.A., Peel, A.D., Drechsler, A., Averof, M., Roth, S., 2010. EGF signaling and the origin of axial polarity among the insects. *Curr Biol* 20, 1042-1047.
- Marcellini, S., González, F., Sarrazin, A.F., PABÓN-MORA, N., Benítez, M., PIÑEYRO-NELSON, A., Rezende, G.L., Maldonado, E., Schneider, P.N., Grizante, M.B., 2016. *Evolutionary Developmental Biology (Evo-Devo) Research in Latin America*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*.
- Marques-Souza, H., Schneider, I., Kohlsdorf, T., Nunes da Fonseca, R., 2012. *Evo-Devo verde-amarela: biologia evolutiva do*

desenvolvimento ganha espaço no Brasil".
Revista Ciência Hoje 298, 39-42.

Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R.S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P.B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R.G., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, A.J., Aspöck, U., Aspöck, H., Bartel, D., Blanke, A., Berger, S., Böhm, A., Buckley, T.R., Calcott, B., Chen, J., Friedrich, F., Fukui, M., Fujita, M., Greve, C., Grobe, P., Gu, S., Huang, Y., Jermin, L.S., Kawahara, A.Y., Krogmann, L., Kubiak, M., Lanfear, R., Letsch, H., Li, Y., Li, Z., Li, J., Lu, H., Machida, R., Mashimo, Y., Kapli, P., McKenna, D.D., Meng, G., Nakagaki, Y., Navarrete-Heredia, J.L., Ott, M., Ou, Y., Pass, G., Podsiadlowski, L., Pohl, H., von Reumont, B.M., Schütte, K., Sekiya, K., Shimizu, S., Slipinski, A., Stamatakis, A., Song, W., Su, X., Szucsich, N.U., Tan, M., Tan, X., Tang, M., Tang, J., Timelthaler, G., Tomizuka, S., Trautwein, M., Tong, X., Uchifune, T., Walz, M.G., Wiegmann, B.M., Wilbrandt, J., Wipfler, B., Wong, T.K., Wu, Q., Wu, G., Xie, Y., Yang, S., Yang, Q., Yeates, D.K., Yoshizawa, K., Zhang, Q., Zhang, R., Zhang, W., Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, C., Zhou, L., Ziesmann, T., Zou, S., Li, Y., Xu, X., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Kjer, K.M., Zhou, X., 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346, 763-767.

Müller, F., 1864. Für Darwin. Wilhelm Engelmann.

Nunes da Fonseca, R., Berni, M., Tobias-Santos, V., Pane, A., Araújo, H., 2017. *Rhodnius prolixus*: from classical physiology to modern developmental biology. GENESIS. Nunes da Fonseca, R., Gomes, H., Araújo, H., 2012 Aspectos morfofuncionais da embriologia dos artrópodes Tópicos avançados em entomologia molecular.

VARGAS, E. R. et al. Innovation in hospitals and the service-dominant logic/Inovacao em hospitais e a logica dominante de servico.(articulo en portugues). *Revista de Gestao em Sistemas de Saude*, v. 3, n. 1, p. 14, 2014. ISSN 2316-3712.

VASCONCELOS, C. R. Innovation in contractor health: a contribution by KANO's methodology/Inovacao em empresas prestadoras de servicos de saude: uma contribuicao atraves da metodologia de KANO.(articulo en portugues). *Revista de Gestao em Sistemas de Saude*, v. 3, n. 1, p. 57, 2014. ISSN 2316-3712.

VENANCIO, D. M.; ANDRADE, D.; FIATES, G. G. S. Innovation in services: a bibliometric study of scientific production in Capes website until September 2013/Inovacao em servicos: um estudo bibliometrico da producao cientifica no portal Capes ate setembro de 2013/Innovacion en servicios: un estudio bibliometrico de produccion cientifica en el portal Capes hasta septiembre 2013. *Revista Electronica de Estrategia e Negocios*, v. 7, n. 1, p. 137, 2014. ISSN 1984-3372.

VILELA, R. A. D. G. et al. Surveillance experience in the sugarcane sector: challenges in disrupting the perilous "marathon" of the sugarcane plantations/Experiencia de vigilancia no setor canavieiro: desafios para interromper a "maratona" perigosa dos canaviais.(articulo en portugues)(Ensayo). v. 19, n. 12, p. 4659, 2014. ISSN 1413-8123.

Panfilio, K.A., Oberhofer, G., Roth, S., 2013. High plasticity in epithelial morphogenesis during insect dorsal closure. *Biology open* 2, 1108-1118.

Panfilio, K.A., Roth, S., 2010. Epithelial reorganization events during late extraembryonic development in a

hemimetabolous insect. *Dev Biol* 340, 100-115.

Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J.W., Cunningham, C.W., 2010. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature* 463, 1079-1083.

Ridley, M., 2010. *Evolution*. Wiley.

Sachs, L., Chen, Y.T., Drechsler, A., Lynch, J.A., Panfilio, K.A., Lassig, M., Berg, J., Roth, S., 2015. Dynamic BMP signaling polarized by Toll patterns the dorsoventral axis in a hemimetabolous insect. *Elife* 4, e05502.

Santos, V.T., Ribeiro, L., Fraga, A., Barros, C.M., Campos, E., Moraes, J., Fontenele, M.R., Araujo, H.M., Feitosa, N.M., Logullo, C., 2013. The embryogenesis of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: the establishment of a new chelicerate model system. *genesis* 51, 803-818.

Savard, J., Marques-Souza, H., Aranda, M., Tautz, D., 2006. A segmentation gene in *tribolium* produces a polycistronic mRNA that codes for multiple conserved peptides. *Cell* 126, 559-569.

Schmidt-Ott, U., Lynch, J.A., 2016. Emerging developmental genetic model systems in holometabolous insects. *Curr Opin Genet Dev* 39, 116-128.

Schwager, E.E., Schönauer, A., Leite, D.J., Sharma, P.P., McGregor, A.P., 2015. Chelicerata. , in: A. Wanninger (Ed.) (Ed.), *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 3: Ecdysozoa I: Non-Tetraconata* Vienna: Springer Vienna. , pp. 99–139.

Schwager, E.E., Sharma, P.P., Clarke, T., Leite,

, D.J., Wierschin, T., Pechmann, M., Akiyama-Oda, Y., Esposito, L., Bechsgaard, J., Bilde, T., 2017. The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution. *bioRxiv*, 106385