Raquel Dietsche Monfardini

**Evolução das vias de controle do desenvolvimento
tecidual em holometábolos**

**Evolution of the control pathways of tissue
development in holometabolous insects**

**São Paulo
2018**

Raquel Dietsche Monfardini

**Evolução das vias de controle do desenvolvimento
tecidual em holometábolos**

**Evolution of the control pathways of tissue
development in holometabolous insects**

Versão corrigida

Versão original encontra-se disponível na biblioteca do Instituto de
Biociências – Universidade de São Paulo

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências Biológicas, na Área de
Biologia/Genética.

Orientadora: Tatiana Teixeira Torres

Coorientador: Alisson Gontijo

São Paulo
2018

Agradecimentos

Agradeço primeiramente meus orientadores, Tatiana e Alisson, por proporcionarem a grande oportunidade que foi trabalhar com este projeto. Obrigada pela paciência, o incentivo, a dedicação e tempo que depositaram em mim. Agradeço, principalmente, por me ajudar a aprender e fazer boa ciência. Muito obrigada pelas oportunidades e experiências únicas que vocês me proporcionaram.

Agradeço a todos do Laboratório de Genômica e Evolução de Artrópodes. Gisele, Marina, Nancy, Valéria, Nancy Lo, Mauimy, Juliana, Carla, Gustavo, Pedro e Vanessa, muito obrigada por estarem comigo nos meus sucessos e ataques de revolta. Adiciono aqui o Tiago, que faz parte do nosso grupo apesar de pertencer a outro laboratório. Nossas discussões sobre séries e filmes foram momentos de descontração essenciais. Agradeço especialmente pelo apoio e ajuda que vocês me deram durante este projeto e por engordarem junto comigo!

Aproveito também para agradecer a todos do Laboratório de Biomedicina Integrativa, em Portugal, por terem me acolhido tão carinhosamente. Joana, Andréia, André, Ângela, Ivana, Ana e Felipe, muito obrigada por me receber de braços abertos e por tudo que vocês me ensinaram. Obrigada por ficarem comigo até tarde da noite ou nos fins de semana no laboratório! Parte desta dissertação não teria sido realizada sem a participação e ajuda de todos. Um agradecimento especial aos colaboradores Dr^a. Fabiana Heredia, Dr. Andres Garelli, Dr. Takashi Koyama e Catarina Nunes por terem realizados os ensaios de dano tecidual.

A todos do Laboratório de Entomologia Integrativa, em Campinas, pela colaboração na realização de alguns dos ensaios experimentais. Um agradecimento mais que especial para a professora Patrícia, o Vinícius e o Rafael por me ajudarem ativamente na manutenção das larvas e pupas enquanto estava realizando os ensaios de dano.

Agradeço a agência de fomento CNPq e FAPESP (processo 2015/20183-8) pelo financiamento, sem o qual essa dissertação não se realizaria. O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, mas igualmente importante, agradeço à minha família. Seu amor e apoio incondicionais, mesmo longe de casa, foram essenciais para me manter no caminho da pesquisa. Muito obrigada por ouvir minhas reclamações e dúvidas, que inevitavelmente apareceram durante todo meu crescimento pessoal. Além disso obrigada por aguentarem (várias vezes) minhas gatas pentelhas quando tive que viajar!

Índice

Introdução Geral	1
Holometábolos: discos imaginais e sua importância.....	1
Regulação hormonal durante a fase larval.....	3
Expressão gênica.....	6
Perguntas e hipóteses	8
Organização da dissertação.....	9
Conclusões Gerais	10
Evolução das vias de controle do desenvolvimento tecidual em holometábolos.....	10
Resumo	11
Abstract.....	12
Referências Bibliográficas	13

Introdução Geral

A maioria dos organismos são capazes de coordenar seu desenvolvimento frente a perturbações intrínsecas e/ou ambientais. Essa capacidade, observada principalmente durante a fase imatura, permite a formação de indivíduos adultos proporcionais e funcionais. Mesmo sendo observados em inúmeras espécies, os insetos são considerados um ótimo modelo para estudos na área, uma vez que a maior parte das espécies possui ciclo de vida relativamente curto. O melhor exemplo disso é a espécie *Drosophila melanogaster*, que foi utilizada como modelo em grande parte dos estudos iniciais relacionados ao desenvolvimento. Desse modo, em um curto período de tempo é possível observar as consequências de uma perturbação durante o desenvolvimento e tentar compreender os mecanismos regulatórios envolvidos no processo. Um mecanismo observado em *D. melanogaster* e em outros insetos é a extensão do período larval frente a um dano tecidual e este trabalho buscou compreender como ele é regulado em diferentes espécies de insetos e sua evolução.

Holometábolos: discos imaginais e sua importância

Em insetos, são observadas três diferentes formas de desenvolvimento (Gilbert 1949). Algumas poucas espécies possuem desenvolvimento direto (ametábolos), em que o jovem é estritamente uma cópia do adulto, e apenas aumenta seu tamanho corpóreo entre cada muda. Entretanto, a maior parte dos insetos possuem desenvolvimento indireto e são dependentes de metamorfoses para atingir a maturidade. Tais insetos podem ser classificados como hemimetábolos ou holometábolos.

Os hemimetábolos são caracterizados por possuir metamorfose incompleta. Neste caso, os indivíduos jovens se parecem fisicamente com os adultos, porém não possuem algumas características essenciais completamente desenvolvidas, por exemplo a genitália ou asas. Por meio das mudas que ocorrem durante a fase imatura, as características do adulto se desenvolvem gradualmente. Os holometábolos, por sua vez, possuem metamorfose completa, ou seja, ocorre total separação morfológica entre as fases imatura (ou larval) e adulta. A fase larval caracteriza-se por diversas mudas

intercaladas por crescimento corpóreo (delimitando os instar larvais), o que promove um acúmulo de energia que será utilizado durante a fase de pupa. A última muda larval (também chamada de muda metamórfica) forma a pupa, fase em que ocorre a metamorfose de larva para adulto (ou imago). Essa metamorfose acontece por meio da morte celular programada dos tecidos larvais e proliferação e diferenciação dos tecidos adultos a partir de precursores imaginais.

Existem dois tipos de precursores imaginais que originarão os tecidos do adulto: os histoblastos e os discos imaginais. Os histoblastos são agrupamentos de células embrionárias que formarão o abdômen e os órgãos internos do adulto (Roseland & Schneiderman 1979; Curtiss & Heilig 1995). Já os discos imaginais são responsáveis por formar as estruturas cuticulares do adulto, como por exemplo as asas. Cada disco imaginal é um conjunto celular indiferenciado, porém já programado para formar uma estrutura específica (Figura 1). Essa especificidade ocorre durante fase embrionária e depende da expressão espacial e temporal dos genes homeóticos (Scott & Carroll 1987), sendo cada disco imaginal programado por uma combinação específica da expressão desses genes.

Considerando a importância dos discos imaginais na formação do adulto, uma de suas características mais marcantes é sua capacidade de regeneração durante o crescimento larval (Worley et al. 2012). Uma resposta às adversidades ao longo do desenvolvimento, principalmente ao dano tecidual em discos imaginais, é a extensão do tempo larval. Essa propriedade garante tempo para a regeneração dos discos danificados e consequente formação íntegra dos órgãos adultos.

Figura 1: Desenvolvimento dos discos imaginais: Estão representadas as células embrionárias primordiais numeradas de 1 a 10 (A), os respectivos discos imaginais (B) e os produtos que formarão no adulto (C) na espécie *D. melanogaster*. T1 a T3 representam os segmentos torácicos e A1 a A8 os abdominais. Imagem adaptada de Beira & Paro (2016).

Regulação hormonal durante a fase larval

Em holometábolos, tanto os instares larvais quanto a formação da pupa são finamente regulados por um sistema composto principalmente pelos hormônios juvenil (JH), prototorácico (PTTH) e ecdisona. A ecdisona, considerada o principal hormônio da metamorfose, é produzida e secretada pela glândula protorácica (região presente na glândula anelar) e é convertida para sua forma ativa 20-hidroxiecdisona (20E) nos tecidos periféricos, onde promove as alterações na expressão gênica para que ocorra a muda (revisado em Hill et al. 2013). A produção de ecdisona pela glândula protorácica é controlada positivamente por um pulso de PTTH. O hormônio PTTH, por sua vez, é

produzido e secretado por dois pares de neurônios que enervam a glândula protorácica (Figura 2-A; McBrayer et al. 2007).

Além de desencadear a formação da pupa e a metamorfose, a ecdisona também é responsável por controlar as mudas larvais. O que difere as duas situações é uma relação entre a concentração do JH e o peso (Figura 2-B; revisado em Edgar 2006; Shingleton 2010). Durante o desenvolvimento larval o JH é mantido em altas concentrações, permitindo o crescimento do indivíduo e acúmulo de energia. Nessa situação, ainda que haja picos de ecdisona, a elevada concentração do JH inibe a muda metamórfica caracterizando, consequentemente, uma muda larval. Porém, quando a larva atinge um peso crítico, a produção do JH é inibida. Desse modo, o próximo pico de ecdisona desencadeia a formação da pupa e a metamorfose do indivíduo.

Figura 2: Regulação hormonal do desenvolvimento: (A) Produção e secreção de ecdisona controlada pelo PTTH; (B) flutuação nos níveis de concentração dos hormônios JH, PTTH, 20E e do peso larval ao longo do desenvolvimento larval (IIC significa “intervalo até a interrupção do crescimento”). Imagens adaptadas de Hariharan (2012) e Edgar (2006), respectivamente.

Entretanto, qualquer perturbação durante o desenvolvimento larval pode acarretar em mudanças nesse equilíbrio hormonal. Pesquisas utilizando *D. melanogaster* como modelo demonstraram que quando um disco imaginal é danificado ou tem um crescimento descontrolado (caracterizando tumores), há extensão do tempo larval (Simpson et al. 1980; Menut et al. 2007). Com isso, foi levantada a hipótese de que esses discos

danificados secretariam um fator que sinalizaria o atraso para a formação da pupa por meio da redução da produção de E20 (Halme et al. 2010; Hackney et al. 2012).

Apenas em 2012, dois grupos independentes identificaram a proteína Insulin-Like Peptide 8 (Ilp8) como a responsável por essa sinalização em *D. melanogaster* (Colombani et al. 2012; Garelli et al. 2012). Como descrito por Garelli e colaboradores (2012), o peptídeo Ilp8 pertence a uma família de proteínas similares à insulina/relaxina (composta por oito proteínas – Ilp1 a 8), devido a um espaçamento típico de cisteínas na sequência de aminoácidos. Durante o processamento da proteína, as cisteínas favorecem a formação de pontes dissulfeto resultando em uma estrutura similar à insulina, com a produção de um peptídeo C (Figura 3).

Quando um disco imaginal sofre dano tecidual, ele passa a secretar Ilp8. Essa proteína é reconhecida no sistema nervoso central por meio da ativação dos receptores Lgr3 (Colombani et al. 2015; Garelli et al. 2015; Vallejo et al. 2015) e atua negativamente na regulação da secreção de ecdisona, provavelmente por meio da inibição da sinalização do PTTH. A consequência dessa regulação é a extensão do tempo larval, o que garante tempo necessário para que o disco imaginal danificado se recupere por meio de proliferação celular. Além disso, a ausência de Ilp8 durante o desenvolvimento normal acarreta em aumento na assimetria das estruturas formadas pelos discos, sugerindo que essa proteína também é responsável por regular o crescimento sincronizado dos discos imaginais (Garelli et al. 2012).

Ainda que o mecanismo de inibição da síntese de ecdisona por meio da sinalização por parte do Ilp8 não esteja totalmente esclarecido em *D. melanogaster*, é inegável a importância desse gene na regulação da extensão da fase larval frente ao dano tecidual. Além disso, uma vez que esse mecanismo regulatório é amplamente observado em insetos, é possível que o gene *ilp8* tenha um papel fundamental nessas espécies.

Figura 3: Processamento de insulina/relaxina: Insulina/relaxina são codificadas como pré-pró-hormônios que necessitam de etapas de processamento para retirada do peptídeo sinal e da cadeia C, secretada junto com a proteína madura. O “C” representa o aminoácido cisteína (editado de Støy et al. 2007).

Expressão gênica

Perturbações estocásticas ocorrem naturalmente durante o desenvolvimento, ocasionando em uma manutenção basal de concentrações da proteína *Ilp8*, que regula as consequências dessas flutuações. Entretanto, danos nos discos imaginais acarretam em um aumento na concentração de *Ilp8*. Considerando a estrutura de um gene eucarioto, o controle da expressão gênica e, consequentemente, da síntese de proteína, pode ser realizado por meio de inúmeros processos que incluem: (1) regulação da taxa de transcrição do gene, (2) regulação do processamento do RNA mensageiro (mRNA) primário, (3) regulação da taxa de tradução do mRNA e (4) processamento e ativação ou inativação da proteína final (Alberts et al. 1999). Dessas quatro formas de controle, a regulação da taxa de transcrição tem, provavelmente, um papel proeminente na quantidade de produto final (proteínas ou RNAs funcionais).

De forma simplificada, a transcrição de um gene se inicia por meio do reconhecimento da sua região promotora pela RNA polimerase, enzima responsável por sintetizar o mRNA primário a partir do sítio de iniciação. Entretanto, é necessária também a presença de sequências regulatórias responsáveis por ativar ou inibir o gene. Essas sequências são reconhecidas por proteínas específicas capazes de ligarem-se a elas e com isso direcionar a RNA polimerase para o promotor do gene correspondente (Alberts et al. 1999). Nesse contexto, a ativação das sequências regulatórias pode promover o aumento da expressão gênica em resposta a determinada situação/estímulo.

Ainda que não se saiba muito a respeito da regulação do gene *ilp8*, evidências sugerem que ele responda positivamente frente à ativação das vias de proliferação celular em *D. melanogaster* (Katsuyama et al. 2015). A recuperação de discos imaginais danificados por meio da proliferação celular é iniciada a partir da sinalização da via metabólica *Jun N-terminal kinase* (JNK) (Bosch et al. 2005; Mattila et al. 2005). Em seu trabalho, Katsuyama e colaboradores (2015) demonstraram que a ativação da via JNK estimula as vias JAK/STAT e *Wingless*, que, conjuntamente, proporcionam a regeneração e proliferação celular. Entretanto, além de controlar a resposta no disco imaginal, eles também documentam que a via JAK/STAT é responsável por controlar a comunicação entre o tecido danificado e o resto do organismo, por meio da regulação da expressão do *ilp8*. Nesse contexto, ainda que não completamente esclarecido, intermediários da via JAK/STAT devem atuar como elementos regulatórios para a expressão do gene *ilp8*.

Perguntas e hipóteses

Considerando a importância da extensão da fase larval no controle do desenvolvimento, este trabalho busca compreender como esse mecanismo regulatório evoluiu ao longo da história dos insetos holometábolos. Partindo do conhecimento do gene *ilp8* de *D. melanogaster*, três perguntas devem ser consideradas:

■ Quando o gene *ilp8* surgiu na filogenia dos holometábolos?

Como já discutido, esse gene foi primeiramente descoberto em *D. melanogaster*, mas sabe-se que ele não é exclusivo dessa espécie. Durante a descrição do *ilp8*, Garelli e colaboradores analisaram sequências homólogas a esse gene presente nas 12 espécies de *Drosophila* com genoma sequenciado bem como nos dípteros *Glossina morsitans* (mosca tsé-tsé) e *Rhagoletis pomonella* (conhecida como “larva da maçã”) (Garelli et al, 2012; material suplementar). Assim, pode-se supor que outras espécies de dípteros, ou mais amplamente, outros holometábolos, possuam homólogos ao gene *ilp8*, sendo sua origem anterior à evolução do grupo *Drosophila*. Entretanto, uma hipótese alternativa seria de que a origem do gene *ilp8* tenha ocorrido durante a diferenciação de *Schizophora*, devido a sua presença nas espécies *G. morsitans* e *R. pomonella*. Nesse contexto, é importante avaliarmos quais espécies de insetos apresentam homólogos a esse gene.

■ Este gene sempre esteve associado com a regulação do desenvolvimento?

É importante considerarmos que a função do *ilp8* só foi descrita em *D. melanogaster*, *Drosophila mauritiana* e *Drosophila sechellia* (Garelli et al, 2012; material suplementar) de modo que, mesmo partindo da hipótese de que outras espécies de insetos possuem homólogos a ele, não se sabe se ele sempre esteve relacionado com danos nos discos imaginais ou se possuía outra função primariamente. Uma das hipóteses é que o *ilp8* esteja associado à regulação da duração da fase larval desde sua origem. Por outro lado, a relação entre o gene *ilp8* e a extensão da fase larval pode ser apenas uma inovação de *Drosophila*, e que este mecanismo seja mediado independentemente do *ilp8* em outras espécies, mesmo naquelas que possam ter homólogos a este gene.

■ Como a extensão da fase larval é regulada na ausência do gene *ilp8*?

Ainda que a hipótese inicial suponha que o *ilp8* esteja presente em diversas espécies de insetos, é de se esperar que algumas delas não apresentem homólogos a este gene. Entretanto, sabe-se que a extensão da fase larval frente a um dano tecidual é um mecanismo amplamente observado em insetos holometábolos. Neste caso, é importante determinarmos como a regulação desse mecanismo ocorre na ausência do *ilp8*. É possível que nessas espécies essa extensão seja sinalizada pela mesma via, porém dependente de uma outra proteína. Por outro lado, ela pode ser regulada por um sistema completamente diferente do observado em *D. melanogaster*. Em ambos os casos é essencial o estudo utilizando espécies que não possuam o gene *ilp8*.

Organização da dissertação

Para começarmos a responder essas questões foi realizada, primeiramente, uma busca pelo *ilp8* em dados públicos, para determinarmos quais espécies apresentam seu homólogo (capítulo 1). A partir desse resultado, foram selecionadas quatro espécies-chaves para realizarmos ensaios de dano tecidual associados com experimentos de RNA-seq, de modo a avaliarmos quais genes são diferencialmente expressos na condição com dano tecidual (capítulo 2).

Conclusões Gerais

Evolução das vias de controle do desenvolvimento tecidual em holometábolos

Este trabalho buscou compreender melhor como ocorre a regulação do desenvolvimento tecidual em larvas de insetos holometábolos. Com base em estudos que apontam a proteína Ilp8 como sendo fundamental na regulação do desenvolvimento da espécie *D. melanogaster*, foram utilizadas duas abordagens para entendermos melhor essa regulação: 1) foram realizadas buscas pelo gene *ilp8* em dados públicos de diversas espécies de insetos; 2) a partir dos dados da primeira fase, foram escolhidas espécies com e sem homólogos ao *ilp8* para ensaios de dano tecidual associados ao sequenciamento massivo em paralelo do RNA (RNA-seq).

As buscas pelo *ilp8* retornaram diversas sequências pertencentes ou similares a proteínas da família da insulina em praticamente todos os grandes grupos que fazem parte de Insecta. Entretanto, ao compararmos essas sequências com o *ilp8* de *D. melanogaster*, apenas grupos chave dentro da ordem Diptera apresentaram similaridade com o gene de *D. melanogaster*. Com isso foi levantada a hipótese de que este gene seja uma inovação de Brachycera (Diptera).

A partir dessa hipótese, foram realizados os ensaios de dano associados com RNA-seq em quatro espécies chave. Ainda que todas apresentassem extensão da fase larval, apenas *D. melanogaster* apresentou um aumento de expressão consistente do *ilp8* nas larvas com dano tecidual. Assim, nós levantamos a hipótese de que o *ilp8* adquiriu a função de regulação apenas em *Drosophila* e que, nas outras espécies, o *ilp8* possui outra função. Com isso, nós propomos o *ilp8* como uma inovação de Brachycera, com uma função primordial, e só adquiriu a função de regulação do desenvolvimento em *Drosophila*.

Resumo

A extensão da fase larval em decorrência de danos nos discos imaginais é um mecanismo de controle do desenvolvimento observado em diversas espécies de insetos. Em *Drosophila melanogaster*, esse mecanismo é regulado pela proteína Ilp8, porém não há estudos que buscam compreender como o gene *ilp8* evoluiu bem como essa resposta é controlada em outros insetos. Este trabalho foi um dos primeiros passos para compreendermos como ocorre a regulação do desenvolvimento. O primeiro passo foi determinar quais espécies de insetos possuem homólogos ao *ilp8* de *D. melanogaster*. Por meio de buscas em bancos de dados disponíveis publicamente foi possível encontrar esse gene nos principais grupos de dípteros, sugerindo que sua origem tenha ocorrido durante a diferenciação de Brachycera. Nesse contexto, para avaliarmos se o *ilp8* já estava associado com a regulação do desenvolvimento, foram realizados ensaios de dano tecidual associados com RNA-seq em espécies com (*D. melanogaster*, *Chrysomya megacephala* e *Hermetia illucens*) ou sem (*Manduca sexta*) homólogos ao *ilp8*. Com essa abordagem, foi possível estudar a variação na expressão global em resposta ao dano causado. Ainda que as quatro espécies estudadas apresentavam extensão do período larval em decorrência do dano nos discos imaginais, apenas *D. melanogaster* apresentou aumento na expressão do *ilp8* nas larvas com dano. Esse resultado parece indicar que, apesar de ser relativamente antigo, a associação da proteína Ilp8 com a sinalização do dano durante o desenvolvimento só aconteceu após a diferenciação de *Drosophila*.

Abstract

The metamorphosis delay due to tissue damage in imaginal discs is a control mechanism of larval development observed in several species of insects. This mechanism is regulated by the Ilp8 protein in *Drosophila melanogaster*, but there are no studies about how the *ilp8* gene evolved, and how this mechanism is regulated in other insects. The objective of this project is to understand how the metamorphosis delay evolved as a control mechanism of tissue development. The first step was to determine which insect species have homologs of the *ilp8* gene of *D. melanogaster*. By searching publicly available databases it was possible to find this gene in the main dipteran groups, suggesting that it is an innovation of the Brachycera group. To understand the evolution of the relationship between *ilp8* and the tissue-damage-dependent delay in metamorphosis, we performed tissue damage assays associated with RNA-seq in species with (*D. melanogaster*, *Chrysomya megacephala* and *Hermetia illucens*) or without (*Manduca sexta*) *ilp8* homologues. With this approach it was possible to study the global expression variation in response to the tissue damage. Although the four species studied delayed metamorphosis upon treatment with the DNA-damaging agent EMS, only *D. melanogaster* showed a detectable increase of the *ilp8* expression in the damaged larvae. These results indicate that the metamorphosis-delay function of the *ilp8* gene evolved relatively late during its evolution, when *Drosophila* differentiated from other Brachycera.

Referências Bibliográficas

- Akhmanova A, Steinmetz MO. 2015. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16:711–726.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1999. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular. Capítulo 8, edição universitária, editora Artes Médicas Sul LTDA.
- Alonso J, Santare JF. 2006. Characterization of The *Drosophila melanogaster* Ribosomal Proteome. *J. Proteome Res.* 5:2025–2032.
- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível online em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Beira J V., Paro R. 2016. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma* 125:573–592.
- Blümer N, Schreiter K, Hempel L, Santel A, Hollmann M, Schüfer MA, Renkawitz-Pohl R. 2002. A new translational repression element and unusual transcriptional control regulate expression of don juan during *Drosophila* spermatogenesis. *Mech. Dev.* 110:97–112.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120.
- Bork P, Koonin E V. 1996. Protein sequence motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:366–376.
- Bosch M, Serras F, Martí E. 2005. JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. 280:73–86.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST + : architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 9:1–9.
- Cerretti P, Stireman JO, Pape T, Hara JEO, Marinho MAT, Rognes K, Grimaldi DA. 2017. First fossil of an oestroid fly (*Diptera* : *Calypttratae* : *Oestroidea*) and the dating of oestroid divergences. *PLoS One* 12:e0182101.
- Cherbas L, Lee K, Cherbas P. 1991. Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila* Eip28/29 gene. *Genes Dev.* 5:120–131.
- Chyb S, Gompel N. 2013. Atlas of *Drosophila* morphology: wild-type and classical mutants. Primeira edição, editora Academic Press.
- Colombani J, Andersen DS, Boulan L, Boone E, Romero N, Virolle V, Texada M, Leopold P. 2015. *Drosophila* Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability. *Curr. Biol.* 25:2723–2729.
- Colombani J, Andersen DS, Leopold P. 2012. Secreted Peptide Dilp8 Coordinates *Drosophila* Tissue Growth with Developmental Timing. *Science* (80-.). 336:582–585.
- Cornman RS. 2009. Molecular Evolution of *Drosophila* Cuticular Protein Genes. *PLoS One* 4:e8345.
- Craig EA, Ingolia TD, Manseau LJ. 1983. Expression of *Drosophila* heat-shock cognate genes during heat shock and development. *Dev. Biol.* 99:418–426.
- Curtiss J, Heilig JS. 1995. Establishment of *Drosophila* imaginal precursor cells is controlled by the Arrowhead gene. *Development* 121:3819–3828.
- Dickinson WJ. 1988. On the Architecture of Regulatory Systems : Evolutionary Insights and Implications. *BioEssays* 8:204–208.
- Dorus S, Wilkin EC, Karr TL. 2011. Expansion and functional diversification of a leucyl aminopeptidase family that encodes the major protein constituents of *Drosophila* sperm. *BMC Genomics* 12.
- Eddy S. 1998. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14:755–763.

- Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. 2009. GOrilla: A tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10:1–7.
- Edgar BA. 2006. How flies get their size: Genetics meets physiology. *Nat. Rev. Genet.* 7:907–916.
- Ekengren S, Hultmark D. 2001. A Family of Turandot -Related Genes in the Humoral Stress Response of *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284:998–1003.
- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, et al. 2016. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* 44:D279–D285.
- Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E, Dominguez M. 2012. Imaginal Discs Secrete Insulin-Like Peptide 8 to Mediate Plasticity of Growth and Maturation. *Science* (80-). 336:579–582.
- Garelli A, Heredia F, Casimiro AP, Macedo A, Nunes C, Garcez M, Dias ARM, Volonte YA, Uhlmann T, Caparros E, et al. 2015. Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing. *Nat. Commun.* 6:8732.
- Gilad Y, Mizrahi-Man O. 2015. A reanalysis of mouse ENCODE comparative gene expression data. *F1000Research* 121:1–37.
- Gilbert SF. 1949. *Developmental Biology*. Capítulo 18, 8ª edição, editora Sinauer Associates Inc.
- Goller F, Esch H, Goller F. & Esch H, Goller F, Esch H. 1990. Comparative study of chill-coma temperatures and muscle potentials in insect flight muscles. *J. Exp. Biol.* 150:221–231.
- Goltzené F, Holder F, Charlet M, Meister M, Oka T. 1992. Immunocytochemical localization of Bombyx-PTTH-like molecules in neurosecretory cells of the brain of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Cell Tissue Res.* 269:133–140.
- Gontijo AM, Garelli A. 2018. Mechanisms of Development The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: A relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control. *Mech. Dev.*:1–7.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29:644–652.
- Griffiths AJF, Wessler SR, Carrol SB, Doebley J. 2012. Introduction to genetic analysis. Capítulo 16, décima edição, editora W. H. Freeman and Company.
- Grönholm J, Kaustio M, Myllymäki H, Kallio J, Saarikettu J, Kronhamn J, Valanne S, Silvennoinen O, Ramet M. 2012. Not4 enhances JAK / STAT pathway-dependent gene expression in *Drosophila* and in human cells. *FASEB J.* 26:1239–1250.
- Grönke S, Clarke D-F, Broughton S, Andrews TD, Partridge L. 2010. Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLoS Genet.* 6:e1000857.
- Gu S, Chen C, Hsieh Y, Lin P, Young S. 2015. Modulatory effects of bombyxin on ecdysteroidogenesis in *Bombyx mori* prothoracic glands. *J. Insect Physiol.* 72:61–69.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, et al. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8:1494–1512.
- Hackney JF, Zolali-Meybodi O, Cherbas P. 2012. Tissue Damage Disrupts Developmental Progression and Ecdysteroid Biosynthesis in *Drosophila*. *PLoS One* 7:1–12.
- Hall DC, Gerhardt RR. Flies (Diptera). In Mullen G, Durden L. 2002. *Medical and Veterinary Entomology*. Capítulo 8, p. 127-145, editora Academic Press.
- Halme A, Cheng M, Hariharan IK. 2010. Retinoids Regulate a Developmental Checkpoint for Tissue Regeneration in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 20:458–463.
- Hariharan IK. 2012. How growth abnormalities delay “puberty” in *Drosophila*. *Sci. Signal.* 5:pe27.
- Heather JM, Chain B. 2016. Genomics The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA.

- Hedengren M, Borge K, Hultmark D. 2000. Expression and Evolution of the *Drosophila* Attacin / Diptericin Gene Family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:574–581.
- Hill RJ, Billas IML, Bonneton F, Graham LD, Lawrence MC. 2013. Ecdysone Receptors: From the Ashburner Model to Structural Biology. *Annu. Rev. Entomol.* 58:251–271.
- Hu X, Cherbas L, Cherbas P. 2003. Transcription Activation by the Ecdysone Receptor (EcR / USP): Identification of Activation Functions. *Mol. Endocrinol.* 17:716–731.
- Katsuyama T, Comoglio F, Seimiya M, Cabuy E, Paro R. 2015. During *Drosophila* disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell proliferation with Dilp8-mediated developmental delay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112:E2327–E2336.
- Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer ELL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305:567–580.
- Kromer-metzger E, Lagueux M. 1994. Expression of the gene encoding an insulin-related peptide Evidence for alternative promoter usage. *Eur. J. Biochem.* 434:427–434.
- Lagueux M, Lwoff L, Meister M, Goltzenfi F, Hoffmann JA. 1990. cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta , Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur. J. Biochem.* 254:249–254.
- Landis G, Shen J, Tower J. 2012. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*; Aging (Albany. NY). 4:768–789.
- Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9:357–359.
- Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. 2012. The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 28:882–883.
- Li B, Dewey CN. 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:1–21.
- Mattila J, Omelyanchuk L, Kyttälä S, Turunen H, Nokkala S. 2005. Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. 399:391–399.
- McBrayer Z, Ono H, Shimell MJ, Parvy JP, Beckstead RB, Warren JT, Thummel CS, Dauphin-Villemant C, Gilbert LI, O'Connor MB. 2007. Prothoracicotropic Hormone Regulates Developmental Timing and Body Size in *Drosophila*. *Dev. Cell* 13:857–871.
- McCarthy FM, Wang N, Magee GB, Nanduri B, Lawrence ML, Camon EB, Barrell DG, Hill DP, Dolan ME, Williams WP, et al. 2006. AgBase: A functional genomics resource for agriculture. *BMC Genomics* 7:1–13.
- Menut L, Vaccari T, Dionne H, Hill J, Wu G, Bilder D. 2007. A mosaic genetic screen for *Drosophila* neoplastic tumor suppressor genes based on defective pupation. *Genetics* 177:1667–1677.
- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Flouri T, Beutel RG, Niehuis O, Petersen M. 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* (80-.). 346.
- Mizoguchi A, Okamoto N. 2013. Insulin-like and IGF-like peptides in the silkworm *Bombyx mori*: discovery, structure, secretion, and function. *Front. Physiol.* 4:1–11.
- Nogales E. 2000. Structural Insights into Microtubule Function. *Annu. Rev. Biochem.* 69:277–302.
- Nunes CSD. 2015. Molecular physiology and evolution of a new developmental stability pathway. Dissertação (mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento), Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa Portugal. Disponível online em: <http://hdl.handle.net/10451/20850>
- Pastor-Pareja JC, Wu M, Xu T. 2008. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage

- in *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* 1:144–154.
- Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8:785–786.
- Råberg L, Grahm M, Hasselquist D, Svensson E, B PRSL, Rôberg L. 1998. On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Society*:1637–1641.
- Reinecke JP, Buckner JS, Grugel SR. 1980. Life cycle of laboratory-reared tobacco hornworms *Manduca sexta*, a study of development and behavior, using time-lapse cinematography. *Biol. Bull.* 158:129–140.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2009. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140.
- Roesijadi G, Rezvankhah S, Binnering DM, Weissbach H. 2007. Ecdysone induction of MsrA protects against oxidative stress in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:511–516.
- Roseland CR, Schneiderman HA. 1979. Regulation and metamorphosis of the abdominal histoblasts of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 186:235–265.
- Samakovlis C, Kimbrell DA, Kylsten P, Engström A, Hultmark D. 1990. expression and biological activity. *EMBO J.* 9:2969–2976.
- Sanchez CG, Teixeira FK, Czech B, Preall JB, Zamparini AL, Seifert JRK, Malone CD, Hannon GJ, Lehmann R. 2015. Regulation of ribosome biogenesis and protein synthesis controls germline stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 57:742–768.
- Schäfer M, Borsch D, Hulster A, Schäfer U. 1993. Expression of a Gene Duplication Encoding Conserved Sperm Tail Proteins Is Translationally Regulated in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 13:1708–1718.
- Scott MP, Carroll SB. 1987. The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development. *Cell* 51:689–698.
- Sega GA. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 134:113–142.
- Shingleton AW. 2010. The regulation of organ size in *Drosophila*: Physiology, plasticity, patterning and physical force. *Organogenesis* 6:76–87.
- Shukla E, Thorat LJ, Nath BB, Gaikwad SM. 2015. Insect trehalase: physiological significance and potential applications. *Glycobiology* 25:357–367.
- Siddiki S, Zambare SP. 2017. Studies on Time Duration of Life Stages of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera : Calliphoridae) during Different Seasons. *J. Forensic Res.* 8.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva E V., Zdobnov EM. 2015. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31:3210–3212.
- Simpson P, Berreur P, Berreur-Bonnenfant J. 1980. The initiation of pupariation in *Drosophila*: dependence on growth of the imaginal discs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 57:155–165.
- Steinberg BE, Grinstein S. 2007. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE* 2007:1–5.
- Støy J, Edghill EL, Flanagan SE, Ye H, Paz VP, Pluzhnikov A, Below JE, Hayes MG, Cox NJ, Lipkind GM, et al. 2007. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. 104.
- Suzuki S, Kakuta M, Ishida T, Akiyama Y. 2015. Faster sequence homology searches by clustering subsequences. *Bioinformatics* 31:1183–1190.
- Takayama S, Xie Z, Reed JC. 1999. An Evolutionarily Conserved Family of Hsp70 / Hsc70 Molecular Chaperone Regulators *. *Biochemistry* 274:781–786.
- Tatun N, Singtripop T, Tungjitwitayakul J, Sakurai S. 2008. Regulation of soluble and membrane-bound trehalase activity and expression of the enzyme in the larval midgut of the bamboo borer *Omphisca fuscidentalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38:788–795.

- Trienens M, Kraaijeveld K, Wertheim B. 2017. Defensive repertoire of *Drosophila* larvae in response to toxic fungi. *Mol. Ecol.* 26:5043–5057.
- Vallejo DM, Juarez-Carreno S, Bolivar J, Morante J, Dominguez M. 2015. A brain circuit that synchronizes growth and maturation revealed through Dilp8 binding to Lgr3. *Science* (80-). 350:aac6767-aac6767.
- Wang X, Yu H, Geng L, Xu J, Yu D, Zhang S, Ma Y, Fei D-Q. 2016. Comparative Transcriptome Analysis of *Bombyx mori* (*Lepidoptera*) Larval Midgut Response to BmNPV in Susceptible and Near- Isogenic Resistant Strains. *PLoS One* 11:e0155341.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10:57–63.
- Weston CR, Davis RJ. 2002. The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:14–21.
- Whitworth C, Jimenez E, Doren M Van. 2012. Development of sexual dimorphism in the *Drosophila* testis. *Spermatogenesis* 2:129–136.
- Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS, Barr NB, Kim J, Blagoderov V, Caravas J, Narayanan S, Schmidtott U, Kampmeier GE, et al. 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:5690–5695.
- Worley MI, Setiawan L, Hariharan IK. 2012. Regeneration and Transdetermination in *Drosophila* Imaginal Discs. *Annu. Rev. Genet.* 46:289–310.
- Yang Y, Smith SA. 2014. Orthology inference in nonmodel organisms using transcriptomes and low-coverage genomes: Improving accuracy and matrix occupancy for phylogenomics. *Mol. Biol. Evol.* 31:3081–3092.
- Zhang Z, Palli SR. 2009. Identification of a cis -regulatory element required for 20-hydroxyecdysone enhancement of antimicrobial peptide gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 18:595–605.