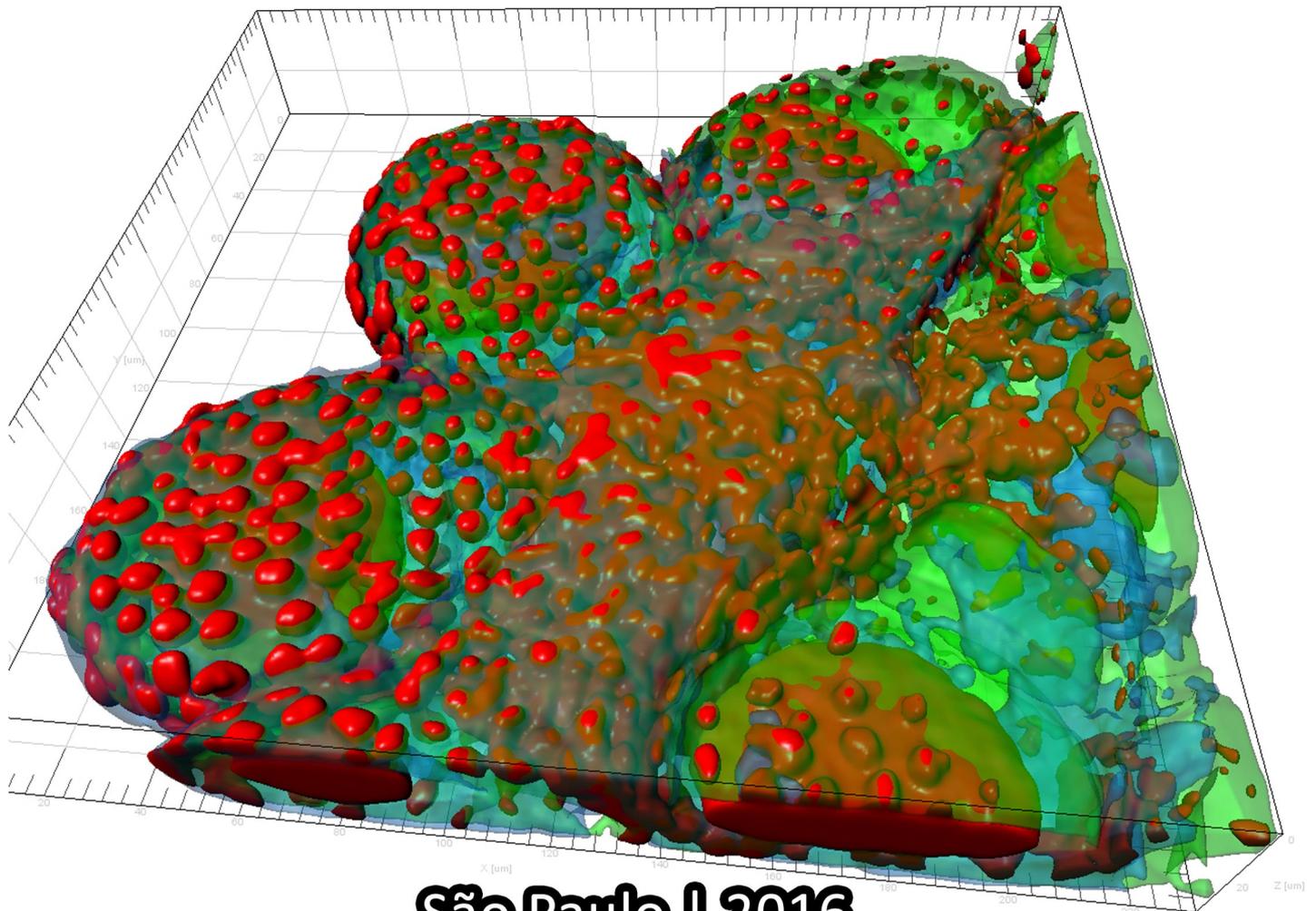


**Jorge Henrique Neves**  
**Estudo da interação celular por meio**  
**da inxina-2 na formação das**  
**junções comunicantes em**  
***Rhynchosciara americana*:**  
**uma abordagem molecular e morfológica**



**São Paulo | 2016**

**JORGE HENRIQUE NEVES**

**Estudo da interação celular por meio da inexina-2 na  
formação das junções comunicantes em  
*Rhynchosciara americana*:  
uma abordagem morfológica e molecular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2016

**JORGE HENRIQUE NEVES**

**Estudo da interação celular por meio da inxina-2 na  
formação das junções comunicantes em  
*Rhynchosciara americana*:  
uma abordagem morfológica e molecular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e do  
Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Maria Machado  
Santelli

Versão Original

São Paulo  
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Neves, Jorge Henrique

Estudo da interação celular por meio da inexina-2  
na formação das junções comunicantes em *Rhynchosciara*  
americana: uma abordagem morfológica e molecular /  
Jorge Henrique Neves; orientador Glaucia Maria  
Machado Santelli. -- São Paulo, 2016.

90 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Junções comunicantes. 2. Inexinas. 3.  
*Rhynchosciara americana*. 4. Desenvolvimento  
biológico. I. Machado Santelli, Glaucia Maria ,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Jorge Henrique Neves

Título da Dissertação: Estudo da interação celular por meio da inxina-2 na formação das junções comunicantes em *Rhynchosciara americana*: uma abordagem morfológica e molecular

Orientador(a): Profa. Dra. Glaucia Maria Machado Santelli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **663/14** referente ao projeto intitulado: “*Estudo da interação celular entre inescinas na formação das junções comunicações em Rhynchosciara americana: Uma abordagem morfológica e Molecular*” sob a responsabilidade de **Jorge Henrique Neves**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 29 de abril de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Aos meus amados pais Mirian e Erivelto,  
aos meus queridos irmãos Luciana e  
Gustavo e a minha amada noiva Geysse  
por serem a maior prova do amor de  
Deus para mim.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus principalmente por ser simplesmente um Pai de amor.

Aos meus pais Mirian e Erivelto Neves por serem as pessoas que eu mais admiro, por sempre me incentivar e aconselhar, sem vocês eu não teria conseguido concluir este trabalho.

À Profa. Dra. Glaucia Maria Machado Santelli por me orientar neste trabalho e por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu tinha dúvidas se iria conseguir. Obrigado por todo incentivo e ensinamento e pela possibilidade de concluir este trabalho, é um privilégio ter você como Chefa!

À Dra. Paula Rezende Teixeira por me orientar neste trabalho junto com a Profa. Glaucia e por ter participado da minha formação desde a graduação. Obrigado por todo incentivo, dedicação e principalmente pela amizade, é uma honra conviver com uma verdadeira expert em biologia molecular.

Aos incríveis amigos do BioCeM Chefa, Paula, Evandro, Adam, Camila, Beatriz, Marlene, Marcel, Luana e Natália por ter tido paciência comigo durante a Iniciação Científica e por todo ensinamento transferido. E aos mais contemporâneos Bianca, Marcelo, Anali, Julyane, Stephanie, Bruna, Flávia, Melissa, Sara e Laís pelos momentos inesquecíveis vividos no laboratório.

À minha noiva Geyssi por ter muita paciência e amor comigo.

Ao Evandro pelos conselhos e por ser uma pessoa admirável.

À Camila, Beatriz, Luana e Marcel pelo convívio e por sempre me inspirar.

Ao Adam pelo convívio, conversas sobre ciência e pela companhia na caça as *Rhynchos*.

À Marlene por toda amizade e companheirismo.

À Bianca pela amizade desde a iniciação científica.

À Maria, Melissa, Anali, Flávia, Marcelo e Julyane pelo companheirismo no laboratório e pelos momentos de descontração.

Ao Roberto Cabado pelo apoio na aquisição das imagens e ilustrações gráficas, inclusive na criação das imagens da capa.

E a Regina Valbom por toda paciência e eficiência na secretária.

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys e a Dra. Tatiana Caroline Silveira Corrêa do GaTE Lab pelo suporte no sequenciamento de DNA.

Ao Prof. Fábio e Jônatas pelo convívio e amizade.

Ao Cainã pela amizade de longa data e por ser uma pessoa incrível.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, em especial o Prof. Allysson Coelho Sampaio e a Profa. Vanessa Martins.

À FAPESP (2012/03370-0, 2013/15654-6 e 2015/03389-1), CNPq (310908/2013-2) e Capes/PDS pelo apoio financeiro.

*Um grande artista pode utilizar vários meios de expressão, mas acharemos em todos os seus trabalhos a mesma temática, estilo, conteúdo e abordagem. Logo, não nos devemos surpreender com o fato de o Artista Supremo ter deixado sua assinatura de várias formas. Se você observar com um telescópio galáxias, estrelas e planetas e depois observar com um poderoso microscópio as minúsculas moléculas, os átomos e os elétrons, notará uma similaridade inconfundível em suas estruturas e padrões. O mesmo Criador projetou ambos os níveis de realidade.*

PAUL BRAND

*Às vezes, quando uma voz, por ser demasiado forte, não é clara, captamos no eco a sílaba perdida. Em Deus e na natureza temos a Voz e o Eco.*

HENRY DRUMMOND

*A natureza ecoa seu Criador.*

## RESUMO

Neves JH. Estudo da interação celular por meio de inexina-2 na formação das junções comunicantes em *Rhynchosciara americana*: uma abordagem morfológica e molecular. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

As junções comunicantes medeiam a comunicação entre células e são fundamentais para o desenvolvimento e homeostase em organismos multicelulares. Nos invertebrados as junções são formadas por proteínas transmembrana denominadas inexinas. As junções permitem a passagem de pequenas moléculas através de um canal intercelular, entre uma célula e outra adjacente. O díptero *Rhynchosciara americana* tem contribuído para o estudo da biologia dos invertebrados, bem como para o estudo da interação entre genes, regulação gênica e desenvolvimento biológico. A partir de um banco de ESTs foram identificadas algumas mensagens com homologia as inexinas. Deste modo, o presente trabalho pretende estudar a inexina-2 de *R. americana* pela: caracterização molecular; análise do perfil expressão; e localização celular. Os nossos resultados de caracterização confirmam que a mensagem é de uma proteína de junção comunicante e as análises do perfil de expressão e localização celular mostram que a inexina-2 pode participar de diversos processos fisiológicos ao longo do desenvolvimento de *R. americana*.

**Palavras-chave:** Junções comunicantes. Inexinas. *Rhynchosciara americana*. Desenvolvimento biológico.

## ABSTRACT

Neves JH. Study of cell interaction through innexin-2 in the formation of gap junctions in *Rhynchosciara americana*: a morphological and molecular approach. [dissertation (Masters thesis in Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2016.

The gap junctions mediate communication between cells and are fundamental to the development and homeostasis in multicellular organisms. In invertebrates the gap junctions are formed by transmembrane proteins called innexins. The gap junctions allow the passage of small molecules through an intercellular channel, between a cell and other adjacent. The dipteran *Rhynchosciara americana* has contributed to the study of the biology of invertebrates, as well as for the study of the interaction between genes, gene regulation and biological development. As from a ESTs bank identified some messages with homology connexins. Therefore, this paper aims to study the innexin *R. americana* by: molecular characterization; analysis of the expression profile; and cellular localization. Our molecular characterization results confirm that the message is from a gap junction protein and analysis of the expression and cellular localization profile show that innexin can participate in many physiological processes during the development of *R. americana*.

**Keywords:** Gap junctions. Innexin. *Rhynchosciara americana*. Biological development.

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
CL	Cytoplasmic Loop
CT	C-terminal
EL	Extracellular Loops
EST	Expressed Sequence Tag
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
JTT	Jones–Thornton–Taylor
mRNA	RNA mensageiro
NT	N-terminal
ORF	Open Reading Frame
TM	Transmembrane hélices
TMscore	Template Modeling score

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVO</b> .....	<b>22</b>
3.1 Objetivos específicos.....	22
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 Sistema de estudo.....	23
4.2 Dissecção dos tecidos.....	23
4.3 Lâminas de cromossomos politênicos .....	23
4.4 Extração de DNA genômico .....	24
4.5 Extração de RNA .....	25
4.6 RT PCR .....	25
4.7 qPCR.....	26
4.8 PCR amplificação.....	27
4.9 Reação de clonagem e transformação bacteriana .....	29
4.10 Extração de DNA plasmidial.....	30
4.11 Sequenciamento .....	31
4.12 Análise das sequências .....	31
4.13 Imunolocalização .....	32
4.14 Hibridização in situ .....	33
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>5.1 Caracterização molecular</b> .....	<b>35</b>
5.1.1 Análise da sequência de mRNA de Ra-Inx2.....	38
5.1.2 Análise da sequência putativa da proteína Ra-inx2 .....	42
<b>5.2 Perfil de expressão de Ra-Inx2</b> .....	<b>51</b>
5.2.1 Níveis de expressão em glândula salivar .....	51
5.2.2 Níveis de expressão em corpo gorduroso.....	53
5.2.3 Níveis de expressão em ovário.....	55
5.2.4 Níveis de expressão em testículo .....	57
5.2.5 Níveis de expressão em embrião.....	59
<b>5.3 Localização celular de Ra-Inx2</b> .....	<b>61</b>
5.3.2 Localização cromossômica .....	70
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>73</b>

<b>6.1 Caracterização molecular .....</b>	<b>73</b>
<b>6.1 Perfil de expressão.....</b>	<b>75</b>
<b>6.2 Localização celular .....</b>	<b>78</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Rhynchosciara americana* é uma espécie de díptero pertencente à família dos Sciarídeos que por apresentar características próprias, tem contribuído muito para o conhecimento da biologia celular e molecular dos insetos, como, a identificação dos pufes de DNA, por Breuer e Pavan (1955) e Machado-Santelli e Basile (1975), até estudos mais recentes, como a identificação dos elementos de transposição (Rezende-Teixeira et al., 2008). Historicamente, esta espécie foi descrita primeiramente por Christian R.W. Wiedemann em 1821 (Wiedemann, 1821<sup>1</sup> apud Breuer, 1969), anos mais tarde Nonato e Pavan (1951) redescobriam a espécie e a denominaram *Rhynchosciara angelae*. Em 1969 estudos feitos em por Breuer (1969) demonstraram a sinonímia entre ambas as espécies, fazendo prevalecer o nome de *Rhynchosciara americana* como classificado anteriormente por Wiedemann, 1821.

As características que a espécie *R. americana* apresenta são: um ciclo de vida longo, desenvolvimento sincrônico entre as larvas irmãs do mesmo sexo (Pavan, Cunha, 1969). Os cromossomos politênicos deste Sciarídeo são grandes e com morfologia favorável para preparações citológicas, presença de cromossomos politênicos em diferentes tecidos junto ao fenômeno de amplificação em determinados períodos do desenvolvimento larval dando origem aos pufes de DNA e RNA (Breuer, Pavan, 1955).

Os cromossomos politênicos estão presentes em diferentes órgãos nas várias espécies dos Sciarídeos, estes se desenvolvem a partir de um processo de endociclos que consiste em sucessivas duplicações em núcleos diploides, conhecido como politenia. De forma geral os cromossomos politênicos são várias vezes a largura dos cromossomos mitóticos, sendo longos e largos, permanecem intimamente pareados com os seus homólogos, desta forma estão acompanhados pelo aumento do conteúdo de DNA. Variações nas estruturas destes cromossomos dão origem aos conhecidos pufes de DNA, que apresentam síntese extra de DNA e síntese específica de RNA (Breuer, Pavan, 1955).

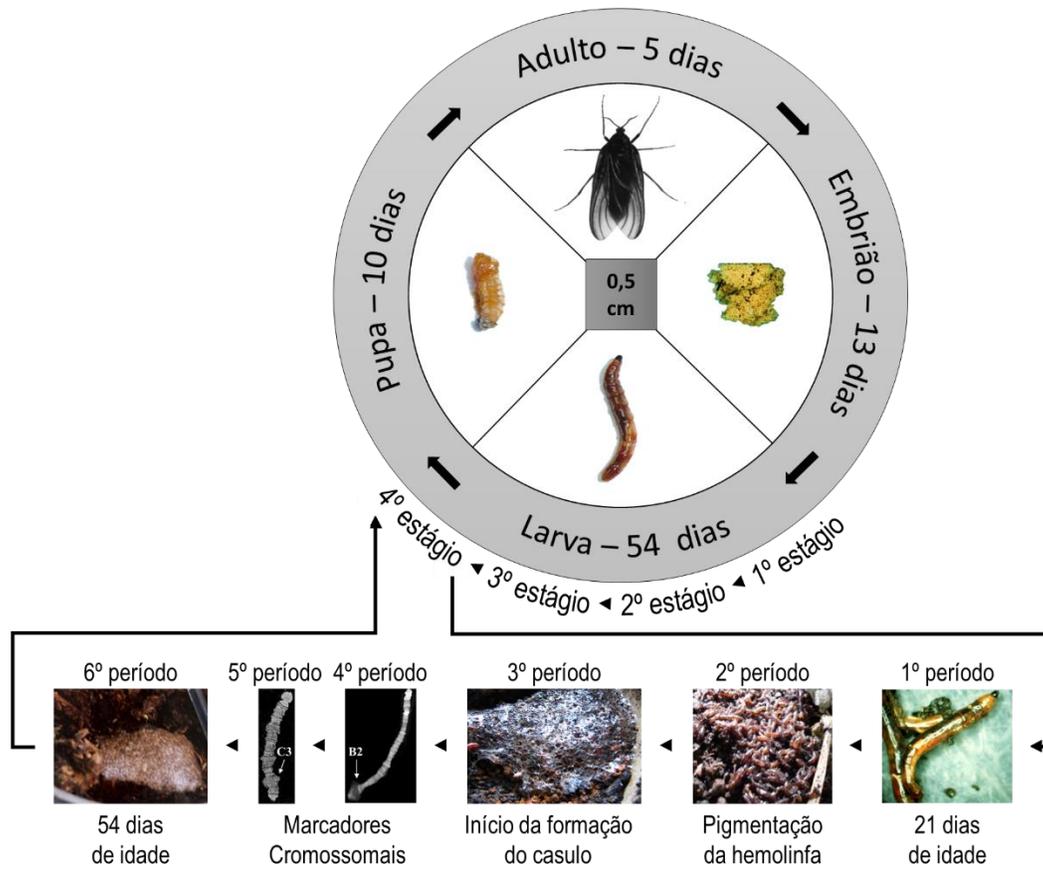
---

<sup>1</sup> Wiedemann, 1821 apud Breuer, 1969, p. 4.

Em *R. americana* é possível encontrar o processo de politenia em diversos tecidos, como glândulas salivares, túbulos de Malpighi, intestinos e vesícula seminal. Os cromossomos politênicos apresentam um padrão característico de faixas e interfaixas transversais, sendo que as faixas mais coradas são devido a condensação da cromatina que correspondem as regiões heterocromáticas (cromômeros), e as interfaixas menos coradas correspondem as regiões eucromáticas.

O ciclo de vida de *R. americana* é de aproximadamente setenta dias (Figura 1). No laboratório as larvas são mantidas a temperatura de 22 °C, quando adulto este Sciarídeo permanece na natureza por aproximadamente uma semana, no final deste estágio, a fêmea adulta tem uma única ovoposição. O desenvolvimento embrionário é de aproximadamente treze dias e após este período os ovos eclodem quase que simultaneamente, dando origem a centenas de larvas irmãs do mesmo sexo. A partir da eclosão o desenvolvimento larval ocorre sincronicamente e é dividido em quatro estágios delimitados pelas mudas (ecdise). No quarto e último estágio que compreende a maior parte do ciclo de vida larval e ocorre os mais estudados pufes de DNA e RNA. O quarto estágio é subdividido em seis períodos caracterizados por marcadores morfológicos e cromossômicos.

O segundo período do quarto estágio larval é caracterizado pela coloração avermelhada das larvas causado pela pigmentação da hemolinfa. Depois, o terceiro período é caracterizado pela secreção de uma rede delicada que dará origem ao casulo comunitário, também neste período as larvas param de se alimentar e movimentar. No quarto período ocorre o aparecimento do primeiro marcador cromossômico, com a expansão do pufe de DNA na região 2 do cromossomo B (pufe B2), neste período a rede adquiriu maior consistência e as larvas assumem a posição curva. O quinto período ocorre o aparecimento do pufe de DNA na região 3 do cromossomo C (pufe C3). O sexto e último período do quarto estágio larval é também conhecido como pré-pupa, as larvas assumem uma posição reta e estão individualizadas dentro do casulo. Em seguida, a muda pupal finaliza o período larval dando início a metamorfose da fase adulta.



**Figura 1** – Ciclo de vida do Sciarídeo *R. americana*.

O sciarídeo *R. americana* pode contribuir fortemente para o conhecimento das junções comunicantes entre os insetos. Diferente de outros organismos, como encontrado em *Drosophila*, o desenvolvimento larval e ovariano ocorre sincronicamente, e cada ovócito está associado a uma única e gigante célula nutridora. Estudos morfológicos e moleculares das junções comunicantes têm tido um papel imprescindível para o conhecimento da biologia do desenvolvimento nos invertebrados. Em especial, as junções têm um papel fundamental em diversos processos ao longo do desenvolvimento de insetos, como durante a ovogênese, embriogênese e o desenvolvimento do sistema nervoso. No entanto, o conhecimento durante os demais processos fisiológicos em insetos é pouco conhecido, como durante a espermatogênese e o desenvolvimento de órgãos como glândula salivar e o corpo gorduroso.

Com objetivo de caracterizar as junções comunicantes em *R. americana*, a partir de um banco de cDNA construído com mRNA de ovário, foram encontrados três genes com homologia as inxinas (Ra-Inx2, Ra-Inx4 e Ra-Inx7). Neste trabalho especificamente vamos realizar a caracterização molecular, analisar os níveis de expressão gênica e a localização celular de Ra-Inx2.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A comunicação entre o citoplasma de uma célula com o de outra adjacente é fundamental, principalmente em organismos multicelulares. Nos animais as junções comunicantes são formadas por subunidades proteicas que fazem a comunicação intercelular permitindo a passagem de íons e pequenas moléculas através de canais justapostos de células adjacentes (Cao 1998; Phelan 2005; Phelan, Starich 2001).

As subunidades proteicas são responsáveis pela perfeita acoplagem entre um hemicanal e outro adjacente, formando um canal intercelular (Goodenought et al., 2009). Desta forma, um hemicanal consiste em um anel de proteínas multiméricas, onde cada proteína possui quadro domínios transmembrana em alfa-hélice, duas alças extracelulares, uma alça intracelular, sendo que as extremidades amino-terminal e carboxi-terminal estão localizadas intracelularmente (Hua et al., 2003; Unger et al., 1999) (ver na Figura 2, parte A). O poro no centro do canal é responsável pela passagem de íons, siRNAs, oligonucleotídeos, nucleotídeos cíclicos (Hervé et al., 2005).

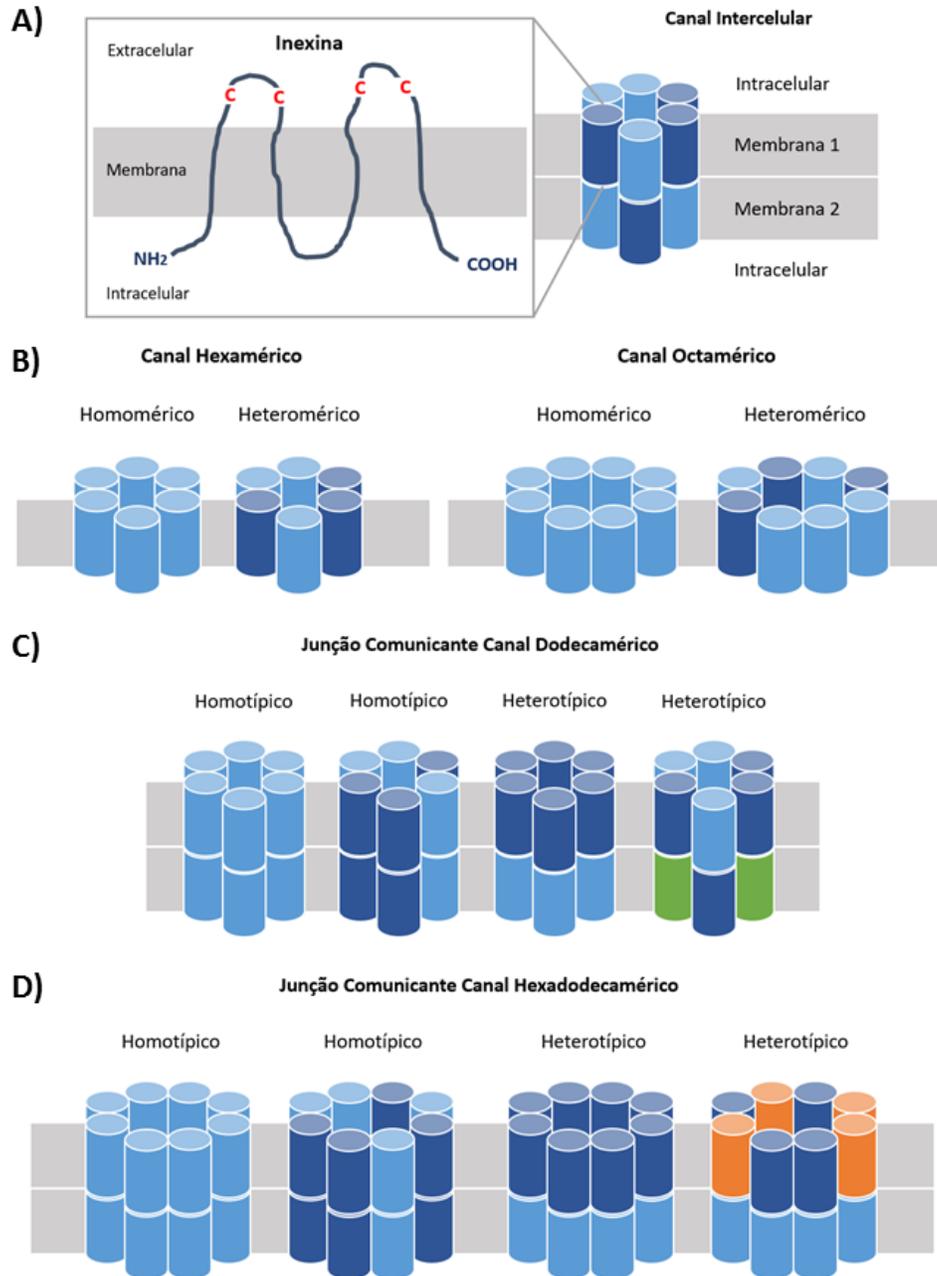
O hemicanal pode ser classificado quanto a sua composição: homomérico quando constituído por subunidades idênticas; ou heteromérico quando constituídos por subunidades diferentes (Figura 2, parte B). Para que ocorra a formação das junções, dois hemicanal de células diferentes devem estar acoplados, formando um único canal intercelular. O canal intercelular também é classificado conforme sua configuração: homotípicos quando um hemicanal acoplado possui a mesma configuração a outro adjacente; ou heterotípicos quando cada hemicanal acoplado possui diferente configuração (Cottrel, Burt, 2005; Machado-Santelli, Ionta 2012; Stebbings et al., 2000) (ver na Figura 2, partes C e D).

Nos vertebrados as junções são formadas por conexinas e panexinas, sendo que as inexas formam as junções em invertebrados (Barbe et al., 2006; Bauer et al., 2005). As conexinas são nomeadas de acordo com sua massa molecular em kDa. Foram encontrados 20 genes em *Mus musculus*, 21 genes em *Homo sapiens* e até 36 genes da família das conexinas foram encontrados em peixe-zebra (Eastman et al., 2006; Sohl, Willecke et al.,

2002). Os canais formados por conexinas são dodecaméricos (Scemes et al., 2007). Os canais intercelulares dodecaméricos são constituídos por dois canais hexaméricos (seis subunidades), formando um canal intercelular de doze subunidades (Figura 2, parte C). Devido a esta definição fortemente aceita em vertebrados, passou-se a ser utilizada também em invertebrados.

No entanto diversos estudos revelaram que os canais de inexas têm maiores dimensões que os canais de conexinas (Blagburn et al., 1999; Leitch et al., 1992; Ohta et al., 2011). Estudos de crio-microscopia eletrônica e reconstrução em 3D revelaram que a inexina-6 possui uma dimensão maior que a conexina-26, formando canais hexadodecaméricos (Oshima et al., 2013, 2016). As junções que formam os canais hexadodecaméricos são formadas por dois canais octaméricos (oito subunidades), formando um canal intercelular de dezesseis subunidades (Figura 2, parte D).

Embora as conexinas e as inexas possuam homologia funcional, não têm nenhuma homologia na sequência de aminoácidos (Phelan et al., 1998; Phelan, 2005). No entanto, os membros da família das panexinas presente nos vertebrados têm homologia com a sequência de aminoácidos das inexas, mas o alinhamento das sequências não mostra alta identidade. (Abascal et al., 2013; Panchina et al., 2000). Outros estudos mostram que a conformação fisiológica das panexinas é diferente das inexas e podem não formar junções (Dahl, Locovei, 2006; Sosinsky et al., 2011). Os canais hexadodecaméricos pode ser uma característica própria dos invertebrados, mas curiosamente a panexina-2 encontrada nos vertebrados possivelmente forma um canal octamérico ou pelo menos maior que hexamérico. (Ambrosi et al., 2010).



**Figura 2** – Classificação dos canais de junções comunicantes. A) Topologia de uma proteína de junção comunicante com quatro domínios transmembrana, duas alças extracelulares, uma alça intracelular e as extremidades amino-terminal e carboxi-terminal localizadas intracelularmente. B) Esquema dos canais de junção comunicante hexaméricos formados por seis subunidades e octaméricos formados por oito subunidades, sendo classificados como homoméricos quando as subunidades são idênticas entre si, ou heteroméricos quando as subunidades são diferentes entre si. C) Classificação dos canais intercelulares dodecaméricos formados por doze subunidades, podendo ser homotípicos quando os dois canais acoplados possuem a mesma configuração, ou heterotípicos quando possuem diferente configuração. D) Classificação dos canais intercelulares hexadodecaméricos formados por dezesseis subunidades, podendo ser homotípicos ou heterotípicos.

As junções comunicantes em invertebrados foram primeiramente identificadas por Phelan et al. (1998), que mostraram que a proteína Shaking-B poderia formar canais intercelulares. Por ser análogo as conexinas dos vertebrados, em invertebrados foram denominadas de inexinas. As inexinas passaram a ser identificadas por mapeamento genômico e classificadas numericamente usando os prefixos de cada organismo encontrado seguido da abreviação “Inx”, por exemplo: Dm-Inx4 (inexina-4 de *Drosophila melanogaster*). No entanto, esta classificação ocorre separadamente em cada organismo, desta forma Dm-Inx4 não tem necessariamente principal homologia com Ce-Inx4 de *Caenorhabditis elegans*.

Em invertebrados foram encontrados 21 genes da família das inexinas no nematoide *C. elegans* e em sanguessugas medicinais (Altun et al., 2009; Kandarian et al., 2012). Em comparação, a diversidade de genes de inexinas encontrados em artrópodes é menor. Estudos genômicos em *Drosophila melanogaster* identificaram oito genes da família das inexinas com diversas isoformas diferentes (Bauer et al., 2005; Phelan, 2005; Zhang et al., 1999). Estudos realizados em *Bombyx mori* identificaram três inexinas (Hong et al., 2008; Hong et al., 2009). Em *Aedes aegypti* seis genes que codificam inexinas foram encontrados e mais seis genes foram encontrados no gânglio estoma-gástrico de *Cancer borealis* (Shruti et al., 2014; Weng et al., 2008).

As inexinas possuem um papel importante no desenvolvimento de insetos e outros artrópodes. Em *D. melanogaster*, a (Dm-Inx1) participa do desenvolvimento do sistema nervoso (Watanabe, Kankel, 1992). Em outros organismos a inexina-1 participa do acoplamento elétrico em neurônios do SNC de gafanhotos e no desenvolvimento do sistema estomagástrico de lagostas (Anava et al., 2009; Ducret et al., 2006). Dm-Inx1 e Dm-Inx8 atuam em conjunto para formar os fotorreceptores da retina (Curtin, 2002).

Estudos em *D. melanogaster*, mostram que Dm-Inx3 participa do fechamento dorsal do embrião (Giuliani et al., 2013). Em *Anopheles gambiae* perturbações na expressão da Ag-Inx4 resultam em machos estéreis e Ag-Inx7 é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário (Ostrowski et al., 2008; Thailayil, 2011). Em *Tribolium castaneum* a Tc-Inx7 participa do processo de celularização do blastoderma (Van Der Zee et al., 2015).

Dm-Inx8 participa da transmissão elétrica em sinapses do sistema nervoso (Blagburn et al., 1999; Pézier et al., 2016).

A inxina-2 é uma das inxinas mais estudada em insetos. Dm-Inx2 participa da morfogênese do tecido epitelial embrionário (Bauer et al., 2004; Bohrmann, Zimmermann 2008; Lechner et al., 2007; Lehmann et al., 2006). Estudos recentes mostram que as junções formadas por Dm-inx2 medeiam a transferência intercelular de cálcio durante a cicatrização e a passagem de GDPL-Fucose no disco imaginal das asas (Ayukawa et al., 2012; Razzell et al., 2013). Dm-Inx2 também participa do desenvolvimento dos olhos e do sistema nervoso central (Holcroft et al., 2013; Richard, Hoch 2015). Dm-Inx2 e Dm-Inx3 participam da transmissão dos sinais bioelétricos durante a ovogênese (Lautemann, Bohrmann, 2016). Em *Scylla paramamosain*, Sp-Inx2 tem maior expressão em células do sistema imune (Wang et al., 2015).

## 3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é estudar as junções comunicantes em *R. americana* por meio da inxina-2. Desta forma, por intermédio de uma abordagem molecular e morfológica, realizar a caracterização molecular, analisar os níveis de expressão gênica e sua localização celular. Por fim, associar seu provável papel nos diferentes processos ao longo do desenvolvimento de *R. americana*.

### 3.1 Objetivos específicos

- Caracterizar a sequência nucleotídica de Ra-Inx2, identificando a sequência consenso da proteína e identificar as características de uma proteína de junção comunicante por meio de análises de bioinformática.
- Analisar o perfil de expressão gênica Ra-Inx2 em órgãos de linhagem germinativa e de linhagem somática ao longo do desenvolvimento de *R. americana*.
- Identificar a localização celular da proteína em órgãos de *R. americana* e a localização do gene Ra-Inx2 em cromossomos politênicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Sistema de estudo

As larvas de *R. americana* foram coletadas na região de Ubatuba, estado de São Paulo, Brasil e crescidas em laboratório, usando as condições estabelecidas por Lara et al. (1965), com modificações.

### 4.2 Dissecção dos tecidos

Os órgãos estudados de *R. americana* foram: glândula salivar, corpo gorduroso, testículo e ovário. As larvas foram coletadas e transferidas para o gelo por 5 min, em seguida, foram dissecadas em PBSA (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Os tecidos dissecados foram transferidos para um tubo estéril de 1,5 mL contendo etanol 70% por 15 min. Após este tempo o etanol foi descartado com cuidado e adicionou-se etanol:glicerol (1:1). Os tecidos foram estocados em freezer a -20 °C.

### 4.3 Lâminas de cromossomos politênicos

As lâminas de cromossomos politênicos foram preparadas a partir da glândula salivar de *R. americana*. As larvas coletadas foram transferidas para o gelo por 5 min. Em seguida, foram dissecadas em PBSA, onde um par de glândula salivar foi transferido para um tubo estéril de 1,5 mL contendo etanol:ácido acético (3:1) por 15 min. No momento da análise, a região S1 das glândulas foi separada e corada com uma gota de ácido acético 45% e orceína acética 2%, por 7 min. Em seguida, as glândulas foram colocadas em lâminas cobertas com lamínula, o excesso da solução corante e ácido acético foi retirado. Para liberar os

cromossomos politênicos de dentro da célula, foi feita uma pressão sobre a lamínula, processo denominado de esmagamento. As lâminas foram analisadas ao microscópio de luz para confirmar o período do desenvolvimento de acordo com a abertura dos pufes nos cromossomos politênicos.

#### 4.4 Extração de DNA genômico

Para extração do DNA foram utilizadas de três a cinco larvas de *R. americana*. Os tecidos foram separados em um tubo estéril de 1,5 mL contendo etanol:glicerol (1:1) e mantidos no freezer -20 °C até o momento da extração. No momento da extração os tecidos foram lavados 3X com PBSA (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), em seguida, foi adicionado 300 µL de TMD (25 mM Tris pH 7,5; 20 mM EDTA pH 8; e 20 mM NaCl), 30 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K 200 mg/mL. A reação foi incubada por aproximadamente 60 min a 50 °C. Em seguida, adicionou-se 300 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), depois misturou-se por inversão para então ser centrifugado por 5 min a 14.000 rpm.

A fase aquosa foi transferida para um tubo estéril de 1,5 mL e para precipitação foi adicionado 2,5 vezes do volume de etanol absoluto e 0,1 vezes do volume de acetato de sódio 3M pH 5. Depois de precipitação por aproximadamente 12 horas, o DNA extraído, foi centrifugado por 5 min, em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70%. Centrifugou-se por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante foi retirado com cuidado. O DNA foi seco por aproximadamente 10 min no concentrador Eppendorf modelo 5301 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), em seguida, foi ressuspendido em 40 µL de H<sub>2</sub>O RNAase Free e foi realizado a quantificação no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Incubou-se o DNA com RNAase por 60 min. O DNA genômico recém extraído foi estocado a temperatura de 4 °C.

## 4.5 Extração de RNA

Os tecidos dissecados foram conservados em etanol glicerol (1:1) -20 °C até o momento de extração. Para extração foi utilizado de três a cinco larvas de *R. americana*. No momento da extração em um tubo de 1,5 mL os tecidos foram lavados com PBSA (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). E em seguida, foi adicionado 300 µL da solução de digestão TMD (25 mM Tris pH 7,5; 20 mM EDTA pH 8; e 20 mM NaCl), 30 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K 200 mg/mL. Incubou-se por 50 min a 50 °C e foi feita a extração com 300 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), o tubo foi agitado e centrifugado por 5 min a 14.000 rpm.

A fase aquosa foi transferida para um tubo estéril e foi precipitado com 2,5 vezes do volume de etanol absoluto a -20 °C e 0,1 vezes do volume de acetato de sódio 3M pH 5. Depois de precipitado por aproximadamente 12 horas, o RNA extraído foi centrifugado a 4 °C e 14.000 rpm por 30 min, em seguida, descartou-se o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 4 °C e 14.000 rpm por 5 min. Retirou-se o sobrenadante e o RNA foi seco por 10 min no concentrador Eppendorf modelo 5301. O material foi ressuspendido em 30 µL de H<sub>2</sub>O RNAase Free e foi realizado a quantificação no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

O RNA extraído foi tratado com 1 unit/µL de DNase 1 (Kit: DNase 1, Amplification Grade – SigmaAldrich, St. Louis, Missouri, EUA) para 1 µg de RNA extraído, foi adicionado 1 µL de buffer (Reaction Buffer, 10X) e completado com H<sub>2</sub>O RNAase Free para 10 µL. Incubou-se por 30 min a temperatura ambiente. Para inativação da enzima, foi adicionado 1 µL de Buffer Stop Solution e incubado por 10 min a 70 °C.

## 4.6 RT PCR

Para a síntese do cDNA, foi realizada a reação de RT-PCR a partir da extração de RNA dos de ovário, testículo, glândula salivar, corpo gorduroso e embrião, em diferentes estágios do desenvolvimento de *R. americana*. O RNA foi previamente tratado com DNase

(SigmaAldrich) e para síntese do cDNA foi utilizado o Kit Improm II – Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EUA). Em um tubo estéril, foi adicionado 1 µg de RNA, 1 µL de primer OligodT, para um volume final de 5 µL. A reação foi aquecida no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) a 70 °C por 5 min, e depois foi transferida para o gelo. Em seguida, os demais reagentes foram adicionados: 4 µL de Improm buffer 5X, 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de dNTP Mix, 1 µL de ImpromRT e 6,6 µL de H<sub>2</sub>O RNAase Free para um volume final de 20 µL. Incubou-se a 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min e 72 °C por 15 min.

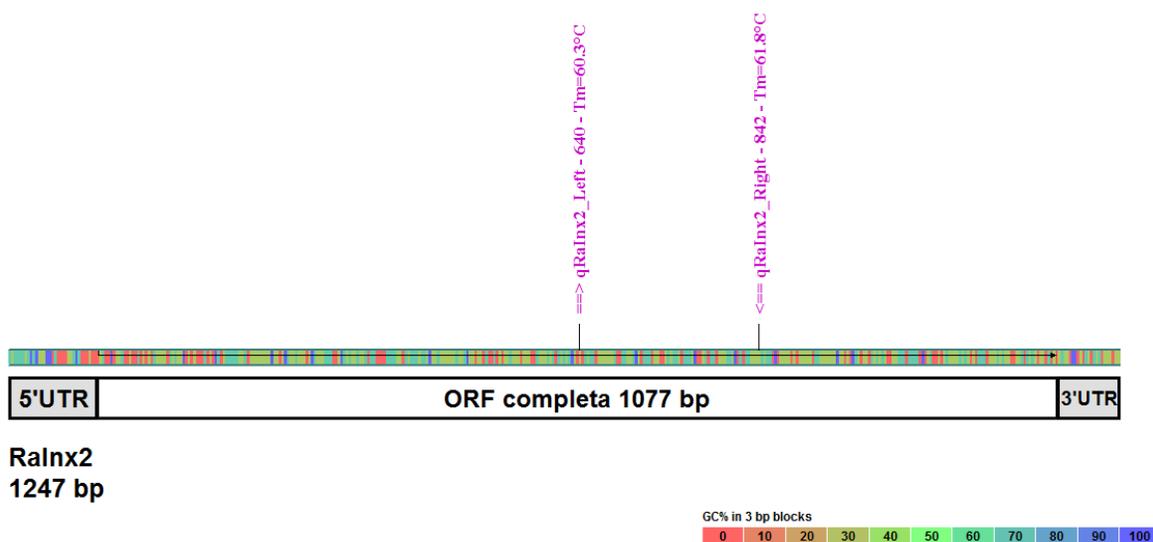
#### 4.7 qPCR

Para análise do perfil de expressão, foi realizado a técnica de qPCR (PCR quantitativo). A reação foi realizada nas seguintes condições: 2,5 µL de buffer 10X PCR, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µL de dNTP, 1 µL de SYBR Green, 1 µL dos primers, 0,5 µL de cDNA, 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), foi completado com H<sub>2</sub>O RNAase Free para 25 µL. Os primers utilizados estão listados na Tabela 1 (ver também o esquema na Figura 3).

As reações foram realizadas no aparelho termociclador Corbett Research modelo Rotor Gene 6000 real-time cycler (Qiagen, Hilden, Alemanha) nas seguintes condições: 94 °C por 5 min, 40 ciclos [94 °C por 20 seg, 53 °C por 20 seg e 72 °C por 30 seg], seguindo o melting. Como calibrador foi utilizado o período mais jovem e os resultados obtidos foram analisados no programa REST 2005. As reações foram realizadas em triplicata, a normalização foi realizada por massa total de RNA.

Primers	Sequência	T <sub>M</sub>
qRalnx2_Left	5' ACGTGTGCTGCGAAGTTATG 3'	55.9°C
qRalnx2_Right	5' AGCGTAAGCAAGCAGAGAGC 3'	57.7°C
qRalnx7_Left	5' TACGAAACCGTCGCACATAA 3'	54.2°C
qRalnx7_Right	5' ATGGAACCGTACCTGTTTCG 3'	54.9°C

**Tabela 1** – Primers utilizados nas reações de qPCR.

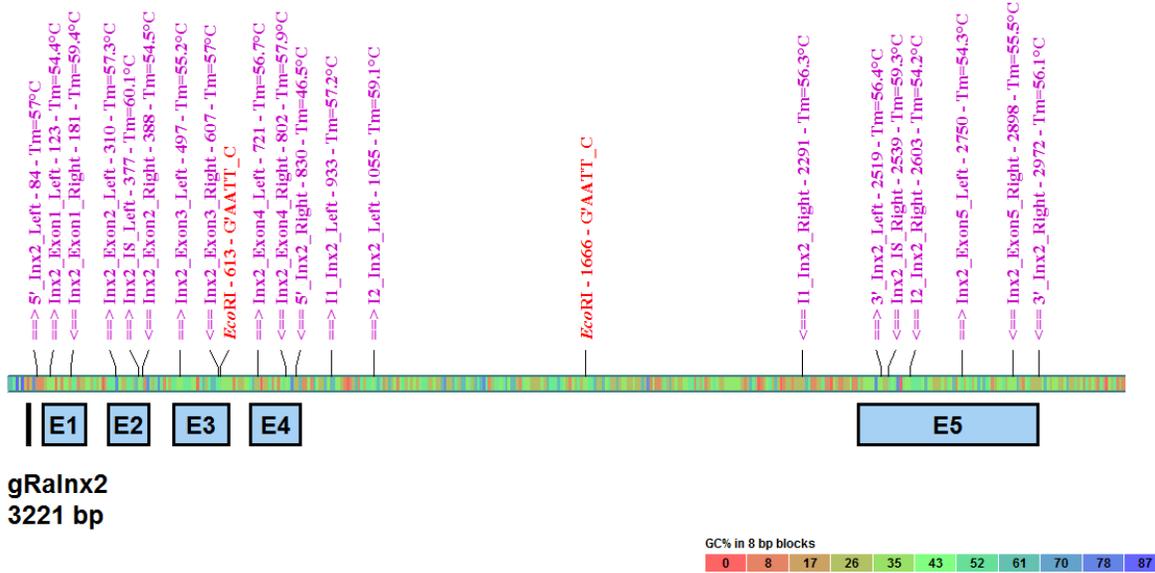


**Figura 3** – Esquema do mRNA de Ra-Inx2 com os primers utilizados para reação de qPCR. Fonte: AcaClone, pDRAW32, 2016.

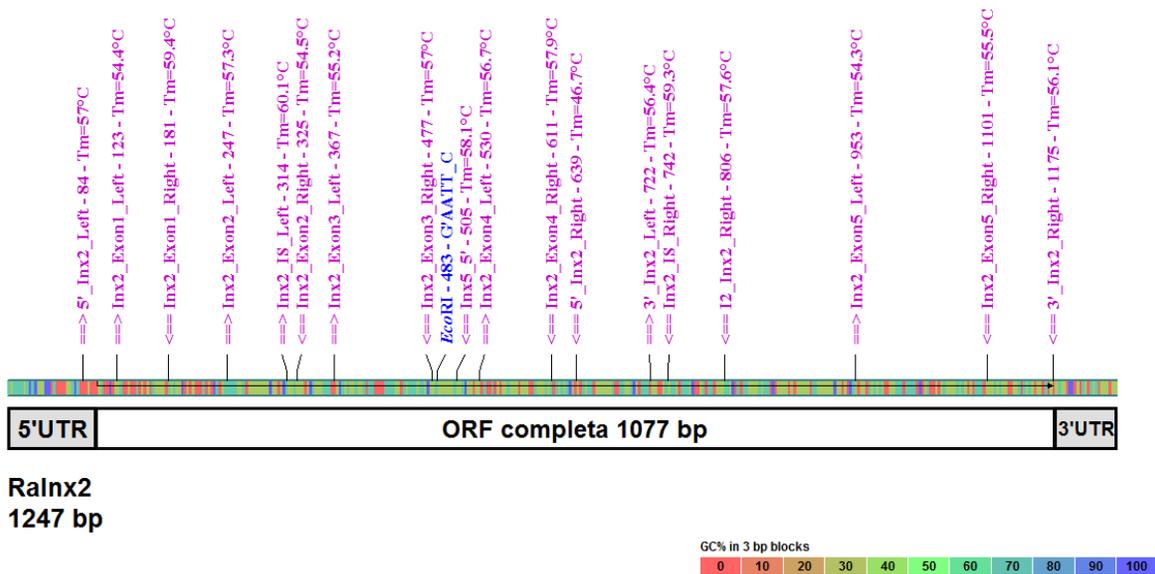
#### 4.8 PCR amplificação

A partir das informações geradas do sequenciamento de um banco de cDNA de ovário de *R. americana*, foram desenhados primers específicos para cada região de Ra-Inx2 (ver o esquema nas Figuras 4 e 5). Os primers estão listados na Tabela 2. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti Thermal Cycler nas seguintes condições: 1  $\mu$ L DNA, 1  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1  $\mu$ L dNTP Mix 20 mM, 2,5  $\mu$ L tampão PCR 10X, 1  $\mu$ L Primer-Left 10 mM, 1  $\mu$ L Primer-Right 10 mM, 0,5  $\mu$ L Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 17  $\mu$ L H<sub>2</sub>O MilliQ para reação final de 25  $\mu$ L. Os primers utilizados variam um pouco nas temperaturas de anelamento e tempo de extensão. Para reação foi utilizado o seguinte programa: 94 °C por 5 min, 35 ciclos [94 °C por 30 seg; 53 °C por 30 seg; 72 °C por 30 seg], 72 °C por 7 min, 4 °C.

Os amplicons gerados foram clonados utilizando o kit pGEM-T easy (Promega) que é ideal para técnica de clonagem dos produtos de PCR. Após a transformação por choque térmico, os clones selecionados com inserto foram crescidos para extração do DNA plasmidial e posterior sequenciamento.



**Figura 4** – Esquema da sequência genômica de Ra-Inx2 com os primers utilizados para reação de PCR. Fonte: AcaClone, pDRAW32, 2016.



**Figura 5** – Esquema do mRNA de Ra-Inx2 com os primers utilizados para reação de PCR. Fonte: AcaClone, pDRAW32, 2016.

Primers	Sequência	TM
Inx2_5'	5' TTATGACATCGGCGTTCAGA 3'	53.9°C
Inx2_IS_Left	5' CGATGCATTATGTTGGGCGA 3'	55.9°C
Inx2_IS_Right	5' AGGTGGAAAATGTGGGACCT 3'	56.4°C
5'_Inx2_Left	5' ACTTGATGAGCCGGACTAAA 3'	53.6°C
5'_Inx2_Right	5' CACGACGTTCAGGAAATTCA 3'	53.0°C
I1_Inx2_Left	5' TCGAGAAATTGCAGTGCATC 3'	53.5°C
I1_Inx2_Right	5' GCGAAAAACCGACACACTTT 3'	54.3°C
I2_Inx2_Left	5' CGTGCTTGAACCATCGTAGA 3'	54.9°C
I2_Inx2_Right	5' GATTGAGAAATGGCCAACGTC 3'	54,1°C
3'_Inx2_Left	5' CCGTTATTTGCCAGCAGTTT 3'	54.0°C
3'_Inx2_Right	5' GCCCAATGAAAGTTCCATCA 3'	53.3°C
Inx2_Exon1_Left	5' ATGATCGTAAATTCGCTAAAACC 3'	51.6°C
Inx2_Exon1_Right	5' AAACGGTCAACTTCGTGTGC 3'	56.3°C
Inx2_Exon2_Left	5' TTTCCGGTCATTCATGGACT 3'	54.0°C
Inx2_Exon2_Right	5' CTGGGGTGTTCATCAATTGTG 3'	52.2°C
Inx2_Exon3_Left	5' TGATGAACGGTTCGACAAATA 3'	51.5°C
Inx2_Exon3_Right	5' GACAACGTGTAATTCGTCCAT 3'	53.4°C
Inx2_Exon4_Left	5' CGCCGATGTCATAACTTCAA 3'	52.9°C
Inx2_Exon4_Right	5' CAGCACACGTATCGGAAAAC 3'	54.1°C
Inx2_Exon5_Left	5' GAATTTGATTTGGCGCAGTT 3'	52.3°C
Inx2_Exon5_Right	5' TTTGAACGCATACGGATTGA 3'	52.4°C

**Tabela 2** – Primers utilizados nas reações de PCR.

#### 4.9 Reação de clonagem e transformação bacteriana

Para reação de clonagem foram desenhados primers específicos para amplificação da *inexina-2* (Tabela 2). Os produtos gerados da amplificação por PCR foram clonados em plasmídeos pGEM-T Easy Vector (Promega). A transformação foi realizada utilizando a bactéria *Escherichia coli* linhagem DH5 $\alpha$  por choque-térmico: 42 °C por 2 min e transferência imediata para o gelo por 2 min. Em seguida, as bactérias recém transformadas foram transferidas para o banho a 37 °C por 60 min e depois crescidas por 12 horas em meio sólido LB (2,5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L triptona, 5 g/L NaCl e 7,5 g/L ágar) à 37 °C. Para seleção de recombinantes, foi adicionado 100 mg/L de ampicilina, 4  $\mu$ L de IPTG e 40  $\mu$ L de X-gal 20 mg/ml.

Após a transformação os clones foram selecionados e crescidos em meio líquido LB (2,5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L triptona e 5 g/L NaCl) contendo ampicilina 100 mg/L por 12 horas a 37 °C sob agitação de 140 rpm. Após este tempo foram feitas as extrações do DNA plasmidial e preparação para o sequenciamento.

#### 4.10 Extração de DNA plasmidial

Após o crescimento sob agitação, a suspensão de bactérias foi centrifugada em um tubo estéril de 1,5 mL por 5 min a 14.000 rpm e foi realizado a extração do DNA plasmidial. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 100 µL da Solução de Ressuspensão (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM EDTA) e 3 µL de RNAase 10 mg/mL. Em seguida, foi homogeneizado e adicionou-se 200 µL da Solução de Lise (1% SDS e 0,2 M NaOH). Homogeneizou-se por inversão e, após 5 min, adicionou-se 200 µL da Solução de Neutralização (3M acetato de potássio e ácido acético 11,5%). Depois, foi homogeneizado por inversão e incubado no gelo por 10 min. Centrifugou-se por 15 min a 14.000 rpm e foi retirado 400 µL do sobrenadante e transferido para um tubo estéril e adicionado 300 µL de isopropanol. Em seguida, foi centrifugado por 10 min a 14.000 rpm a temperatura ambiente e depois foi descartado o sobrenadante e adicionado 500 µL de etanol 70% gelado. Centrifugou-se por 5 min a 14.000 rpm. Depois de descartar o sobrenadante, o DNA plasmidial extraído foi seco a vácuo no Concentrador 5301 por 10 min a 65 °C. Em seguida, foi ressuscitado em 40 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q e quantificado no NanoDrop ND1000.

O DNA plasmidial obtido foi finalmente digerido com a enzima de restrição EcoRI (Promega). Incubou-se por 30 min a 37 °C e em seguida foi confirmado o tamanho do inserto em gel de agarose 0,8%.

#### 4.11 Sequenciamento

Para o sequenciamento dos clones, foi utilizado o protocolo estabelecido no laboratório por Siviero et al. (2006). Foi utilizado o kit de sequenciamento BigDye Terminator (Applied Biosystem) e para cada reação de PCR de sequenciamento foi adicionado: 1 µL BigDye, 3 µL Tampão SM, 3,5 µL H<sub>2</sub>O RNAase Free, 1,5 µL DNA, 1 µL primer e depois transferido para o termociclador, nas seguintes condições: 96 °C por 1 min; 35 ciclos [96 °C por 20 seg, 50 °C por 1 min, 60 °C por 4 min]; 4 °C.

O produto de PCR foi precipitado com solução gelada contendo 23 µL de etanol absoluto, 1 µL de acetato de sódio 3M pH 5 e 1 µL glicogênio 1 g/L. Em seguida, foi realizado breve agitação e as amostras foram transferidas para o gelo por 40 min. Após este período, centrifugou-se por 40 min a 4.000 rpm a 4 °C. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionado 50 µL de etanol 70% gelado. Logo após, centrifugou-se por mais 40 min a 4.000 rpm a 4 °C. Depois o sobrenadante foi descartado e ficou secando por aproximadamente 1 hora no escuro a temperatura ambiente. Por fim, foi adicionado 10 µL de tampão de corrida. Utilizou-se um sequenciador automático de 16 capilares modelo ABI-3130 (Applied Biosystem) em colaboração com a Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys do Instituto de Biociências da USP.

#### 4.12 Análise das sequências

As análises dos eletroferogramas gerados foram realizadas em sistema operacional Linux utilizando os programas *Phred*, *Phrap*, *CrossMatch* e *Consed 17*, cujas licenças de uso são gratuitas para fins acadêmicos e obtidas diretamente com os autores. As sequências nucleotídicas foram analisadas no banco de dados BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, disponível no site do NCBI – National Center for Biotechnology Information. Os alinhamentos foram realizados no programa ClustalX – Multiple Alignment of Nucleic Acid and Protein Sequences (Larkin et al., ClustalX, 2007) e para edição utilizamos o programa BioEdit – Sequence Alignment Editor. Para construção da árvore filogenética, foi utilizado

o método de *Maximum Likelihood* disponível no programa MEGA 6 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura et al., MEGA 6, 2013).

Foi utilizado o programa ORF-Finder (Open Reading Frame Finder) para determinar a sequência de aminoácidos correspondente a cada trinca de nucleotídeos. Para identificar os possíveis domínios transmembrana foi utilizado o programa Topcons (Bernsel et al., Topcons, 2009). Para construção da topologia da proteína Ra-inx2 foi utilizado o programa Protter (Omasits et al., Protter, 2014) e para construção tridimensional da predição da proteína Ra-Inx2 foram utilizados os programas RaptorX – Protein Structure and Function Prediction (Källberg et al., RaptorX, 2012). Outras ferramentas de biologia molecular também foram utilizadas, como os programas disponíveis no site do NCBI.

#### 4.13 Imunolocalização

Para identificar a localização da proteína Ra-Inx2 nas células de *R. americana*, foi realizado imunolocalização nos seguintes tecidos: corpo gorduroso, testículo e ovário. Após a dissecação das larvas, os tecidos foram transferidos para um tubo contendo formaldeído 3,7% por 15 min. Em seguida, os tecidos foram lavados duas vezes em PBSA, permeabilizados com 1% Triton X-100 por 10 min e foram lavados duas vezes em PBSA. Logo após, foi adicionado o anticorpo primário anti-inexina2 (1:100) e incubou-se em temperatura ambiente por 12 horas em câmara escura. Após este período, os tecidos foram lavados duas vezes com PBSA por 5 min e depois foi adicionado 7 µL do anticorpo secundário FITC e incubou-se por 2 horas em temperatura ambiente. Para marcação da actina foi adicionado faloidina FITC e 5 µL de RNAase 10 mg/mL e incubou-se por 1 hora. Os tecidos foram lavados com PBSA e as lâminas foram montadas com 2 µL de iodeto de propídio e 8 µL de Vecta Shield (Vector Laboratories, Burlingame, California, EUA).

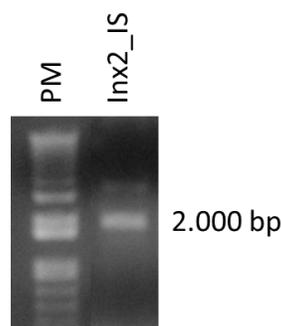
O anticorpo para inexina-2 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Franka Eckardt da Universidade de Bonn na Alemanha e é um anticorpo policlonal gerado em coelho e desenhado a partir da região carboxi-terminal da inexina-2 de *D. melanogaster* (Bauer et al., 2004). As preparações foram observadas ao Microscópio Confocal de Varredura a Laser

(Zeiss, LSM510) e para análise das imagens foi utilizado o programa LSM Image Browser (Zeiss, LSM, 2006).

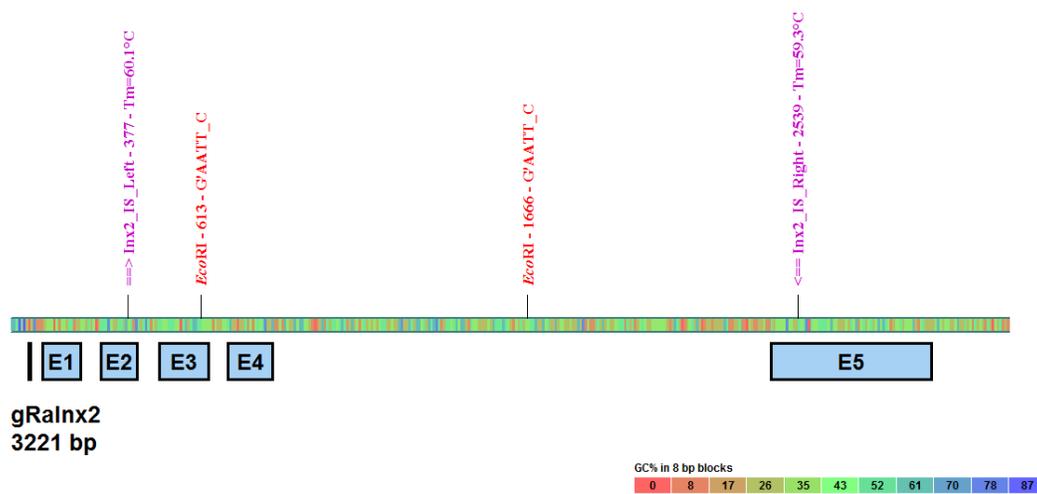
#### 4.14 Hibridização *in situ*

A sonda utilizada para hibridização foi sintetizada a partir da sequência genômica e foram utilizados os primers Inx2\_IS\_left e Inx2\_IS\_Right (ver na Tabela 2). Após a amplificação do produto de PCR foi realizado clonagem e transformação bacteriana. Para confirmar o tamanho da sonda foi realizado uma corrida em gel de agarose 0.8% e foi confirmado que o tamanho corresponde com o número de pares de base (bp) obtidos a partir do sequenciamento do DNA genômico (ver a Figura 6 e o esquema na Figura 7).

Após a síntese da sonda, as lâminas de cromossomos politênicos foram preparadas a partir da glândula salivar de *R. americana* e fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por aproximadamente 4 horas no gelo seco. Depois, os cromossomos foram desnaturados em NaOH 0,07N por 5 min, depois, lavados três vezes em SSC 2X, etanol 70% e etanol absoluto. Depois de secas, as lâminas receberam a mistura de hibridização contendo a sonda previamente marcada com random primer digoxigenina-11-dUTP e desnaturada por aquecimento. As hibridizações foram feitas a 58 °C com SSC 4X, por 12 horas. Após este período, foram reveladas com anti-digoxigenina conjugado com Fluoresceína, e para contra-coloração foi utilizado o iodeto de propídio. As preparações foram observadas ao Microscópio Confocal de Varredura a Laser LSM510 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e para análise das imagens foi utilizado o programa LSM Image Browser.



**Figura 6** – Identificação da sonda utilizada para reação de Hibridização *in situ*.



**Figura 7** – Esquema da sequência genômica de Ra-Inx2 com os primers utilizados para síntese da sonda de Hibridização in situ. Fonte: AcaClone, pDRAW32, 2016.

## 5 RESULTADOS

A partir de uma biblioteca de ESTs gerada pelo nosso grupo, após o sequenciamento de um banco de cDNA de ovário de *R. americana*, identificamos mensagens com homologia as inexinas e análises de bioinformática identificamos três sequências que correspondem a inexina-2, inexina-4 e inexina-7. Seguindo a classificação utilizada para insetos as inexinas serão chamadas de Ra-Inx2, Ra-Inx4 e Ra-Inx7 por pertencerem ao díptero *R. americana*.

### 5.1 Caracterização molecular

A partir do sequenciamento genômico de Ra-inx2 identificamos uma sequência de 2874 pares de base com cinco exons e quatro introns (ver na Figura 8). Desta forma, pudemos identificar os nucleotídeos conservados no início (**GT**) e no término (**AG**) localizados especificamente nas extremidades de cada intron, sendo que esta sequência curta é importante para a maquinaria de splicing reconhecer a sequência a ser retirada durante o processamento do mRNA para formação do mRNA maduro.

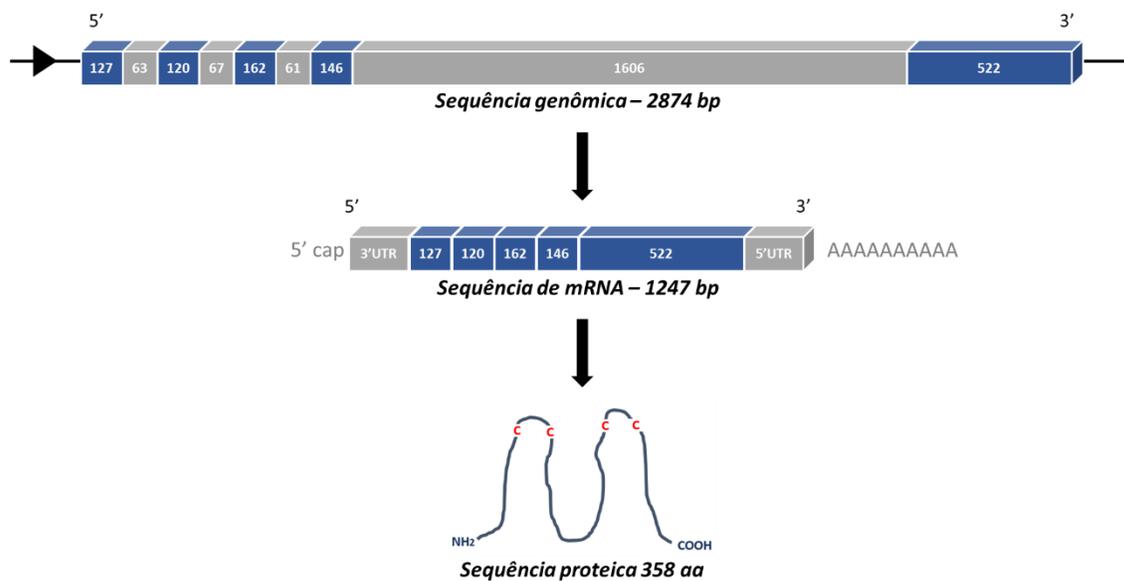
O início da sequência é caracterizado por quatro exons de aproximadamente 120 a 160 pares de base e três introns de aproximadamente 60 pares de base (ver na Tabela 3). A parte final da sequência é caracterizado por um intron longo de 1606 pares de base e o último exon de 522 pares de base. A partir da sequência de cada exon foi possível identificar que a ORF possui 1077 nucleotídeos codificando uma proteína de 358 aminoácidos (ver o esquema na Figura 9).

CGATGCGTTCGAGCTCACAGTCTCCGGGCAGGCATGAACAGTCGCGCGAATGCAAATATAATATTACTTGATGA  
 GCCGGACTAAATTTTTTTCTTATTAAAAATGATCGTAAATTCGCTAAAACCATTGGTTTACCTTTTTTAAATCGA  
 AAAGTTTATGTATTTTTCGATCCTATCTTCAAAATGCACACGAAGTTGACCGTTTACTTTTTGTTAATCTTTTC  
 CTTTATCAG**TTTCGTACACTACTATTGTTTCAAACGGCTGAATTTATCACGTTTTATAATTCGTTTTTTTCAG**TT  
 TCCGGTCATTTCATGGACTGGGAAGCCCATAGACTGCTTTATTGACAAAGAACGTAAAGCTTTTGCCGATGCAT  
 TATGTTGGGCGAATGGAACCTTCACAATTGAAAACACCCCAGAAC**GTGAGAAATCTGTCTTGCATGGACGGC**  
**ATGCCGATTGAATAAAATTCATTTTCGATTCCCTTATTCCAG**TGATGAACGGTCGACAAATATTTGCCAGGCTTA  
 CCACTATCAGCGATACTACCAATGGATCGTTATTATATTAATGGTCGAGGCTGGATTGTTTTCTGTACCAGAG  
 CGTCTGTGGAAGGCTTGGGAACATGGACGAATTCAACAGTTGTCTTCTGATCTGA**GTTTGTCATTTTGAAAAT**  
**TCGTCAAAGTAATCGTAATCATCAGTGATTCCAACACTATTACAG**ACGCCGATGTCATAACTCAAATAGTGAAA  
 ATTATGAAAAAGATAAGAAACGAGTCTTGAGATATTTGAAGATGAATAATAGTCACATACATGGGACTTACGT  
 TTTCCGATACGTGTGCTGCGAAGTTATGAATTTCCCTGAACGTC**GTAAGTATTTCTTTTTTCATGATTGAATAG**  
**TATCTGAGACCGGTTTGTAAATTCATGTTCTTGAACCTCGAGAAATTGCAGTGCATCGCGGTCTCGATCTGTT**  
**ACTTTCTCTGTTGAGTATTTTTATGAAATTTAAAGTTAAATTTTTATCAGTCGCTCTGTCAATAAAAACTAG**  
**CTATAGTACTGAACGTGCTTGAACCATCGTAGATGGCTAACCTTTGCCGCTTCTTCCATTGATTATACTCTTA**  
**AGTCCCTGATATCTTCGTTCCCTAATATGATTATTCCATTGCTCTCTACGATTTTTCTTTGCTACGTTTCTTAG**  
**AAACTTCATGTATCAGATACATGTTGGCCTAACCTAGGAATAGCTAATTTTGTGTTGTTGCTTTATTCCTTTT**  
**TGTTGAACACGTGCGGCCTCAGTTGATTGATTATCACATTGCCCGTCTTTTCCCTCAAACCTAAGACAGCGAACC**  
**TGACGTACCTCTAAAGGTTGGCCTATTTTGCCACCTATTCCAACCGCAACTGGACGCAGCCTTGATCCAGAA**  
**TAAATACTCTTAACCGCTTTTCAGGAAACTTTTCTAGTGCCATACTCGCACCTCCAACCTTTTTGCCTCGGCACT**  
**CTGTCAAATACTTTTTCTAAGTCGACAAAACATGCGGAAACATCTATATTCTTCTCATATAGTTTCTCAATAG**  
**TTCACTTAAGACAGAAAATCGGATCCTGACGACTACCCAAAGGCTCAATCCAACGTGAGGTGTGATACATTC**  
**GCATATATGAATTGAATAGATGTAGAACTTTCTCTTTTCCGCCTTATTTACAGTTAAGTGAATTCATAGCTCTC**  
**AGGCTGTAATAGCGGCTCTAGATTAGCATAATCTGGCGATCATCAGTAGCTTCCATTACACTTTTTTCGTAATG**  
**CAGCAGTTTCATCTTGACATGAACTTCTATATTGAGTAACCTTAACAATAGTGTGAAAAACAGTTTCATCTAGT**  
**GACGTGTTAGAAACCGGCTTCTTTAAAGTATGGATTGAAAAGAATTTGAAATTTAAAGATGAACCGAAGACA**  
**TCAAAAGAGCAGCAGGTATAAAGTGACAATGGATAAAGAAGAATAGAAAACGTTAGGACAAGCCTACATTCAT**  
**CGGTGAATATAAAAGGCTGAAGAAGATTTGACTTGCTTTAAACTGTTGATTGCAACTAATAGGACTCTGTTG**  
**ACAAAATAGTGTCTTTTTCGAATTGAGGTTCAAGAAGATCTCTTTACGAGTGAAAATGCTAAGGTTTCGATAAT**  
**AGATATTTCTTTACATCCGGACAACGCTTTCGAATAGTATGATTTAATATTTTAAAGTTTTACTGTCTTGCAA**  
**TCGTGAAAAGTGAAAACCGATACCTTTTTTCTTTTTTAATTTATTGGCTTTTTTTATTTCTCCAAAATTT**  
**CACAAATTCAAAGTAAAACACAAAACAAAAGTGTGTCGGTTTTTCGCGATTGATTTTTGATTTATTGAATTGA**  
**TTCTGTATCACGAGTTGATTTATTTAACAAATTAATTTATGGCTTTATATGTAGCATATATTTTTAACAAAC**  
**AAAAACTCAAAAACACTCAAACAATAATCTAAATTCATTCCAG**GTTTTGAACATGTACATCTTCAACGTAATT  
 TTCGGTCGATTCTGGAGCCGTTATTTGCCAGCAGTTTTGTCAATTATTTACAACAGAAGGTCCACATTTTCCA  
 CCTTGGCATCGGTTATATTTCCGATTACAGCCAAATGTTTCATACTCAGACGTTGGCCATTCTGGATCTGAGCA  
 GTATCATGATGCTCTCTGCTTACGCTAAATGTTGTCAATGAAAAAGTTTTTGCATTTCTGTACATTTGG  
 TACGTCTTGTGTTGTTTACATCGGGATTGAATTTGATTTGGCGCAGTTTAATTCTGTTATCGTCAACACTTC  
 GTCTGAAAATCATTTCAGTCGTCGACGAAATGGACAGAGCCACTAACGGAAAATGAGGTAAAAAGATTTTACC  
 GAATGACAACATTGGTGACTGGTTCATTATGTTTTGCTCGGACAAAATCTCAATCCGTATGCGTTCAAAGAA  
 ATTTTAGATGAGCTTTCCACAAGCAAAGAATTGTTGAATAACGATATTGTT**TGA**TGGAACCTTTCATTGGGCCC  
 AATGAAAATGCATTCATTAGCAACGCTAATTTTCAGTTACAATTTCTTCAAGTCTTATGTCCCGAATATTGGGAA  
 ACATTTCTATTCGGCCTAATATTTATCCAGTTATGAAATTCGAGCATTAGCTATTTCATGAAGTGAAAAGAAATA  
 AATCTGCGACTAAAATCTTGTAATAATCAAAAACAGTTGTTGTTGACTTCACAAAATAAGAAATCTAGTTACA  
 AAAAAAAA

**Figura 8** – Sequência de nucleotídeos do gene Ra-Inx2. Em negrito mostrando o códon iniciador (ATG) e o último códon (TGA). As regiões intrônicas estão destacadas em negrito e sublinhado. E a região promotora está sublinhado no início da sequência.

Sequência	Pares de Base (bp)
Exon-1	127 bp
Intron-1	63 bp
Exon-2	120 bp
Intron-2	67 bp
Exon-3	162 bp
Intron-3	61 bp
Exon-4	146 bp
Intron-4	1606 bp
Exon-5	522 bp
<b>Total</b>	<b>2874 bp</b>

**Tabela 3** - Número de pares de base (bp) em cada região da sequência genômica de Ra-Inx2.



**Figura 9** – Esquema mostrando a estrutura de Ra-Inx2. Primeiro a sequência genômica de 2874 bp. Em seguida, a sequência de mRNA de 1247 bp depois de ser transcrito e processado. Por último a sequência traduzida de 358 aa.

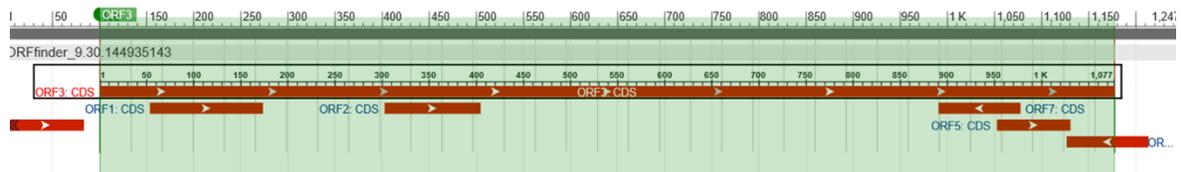
### 5.1.1 Análise da sequência de mRNA de Ra-Inx2

Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento do mRNA de Ra-Inx2 identificamos uma ORF de 1077 nucleotídeos que codifica uma proteína putativa de 358 aminoácidos (ver na Figura 10 e o esquema na Figura 11), confirmando com os resultados obtidos da sequência genômica de Ra-Inx2.

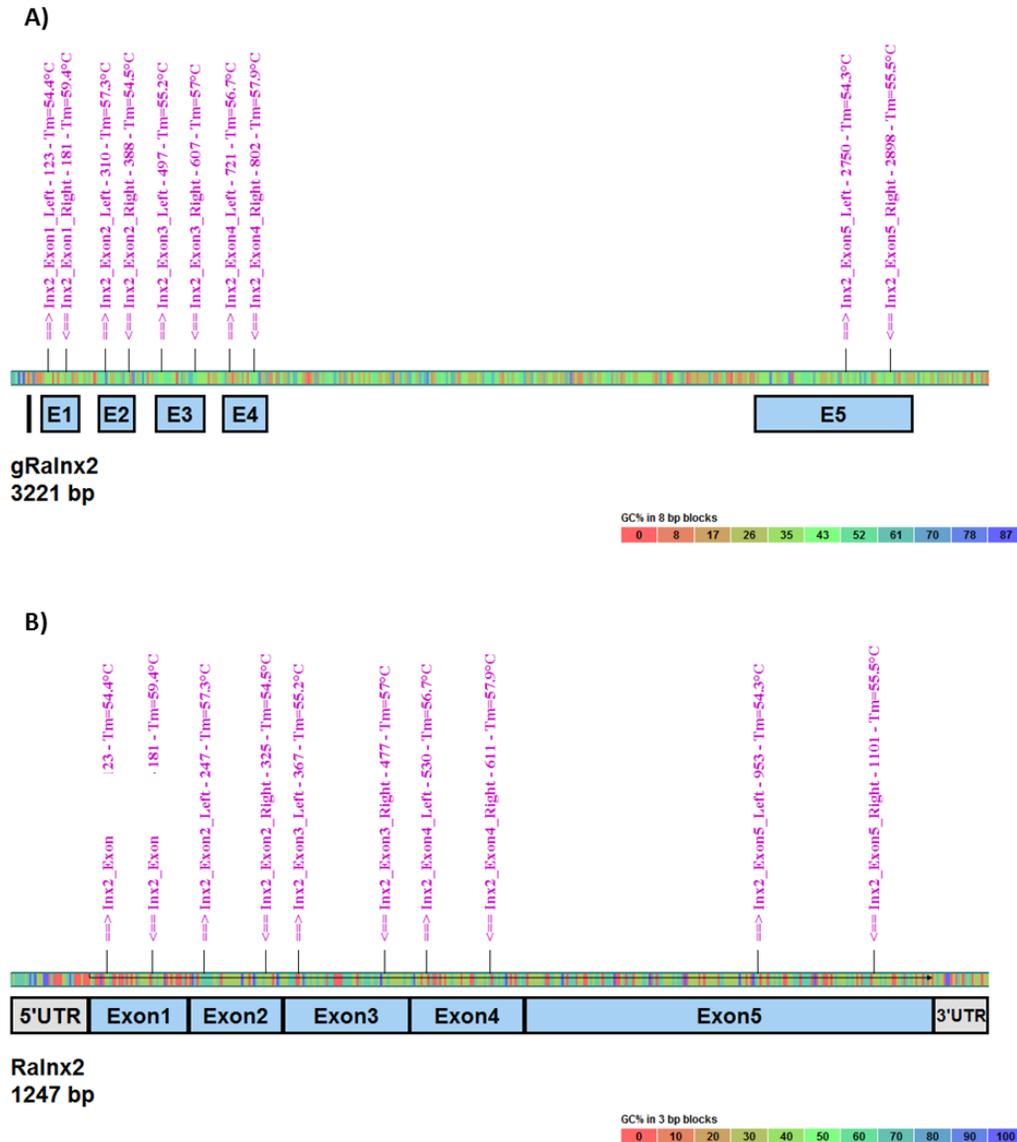
A partir do sequenciamento desenhamos primers específicos (ver o esquema na Figura 12) para cada exon com o objetivo de determinar se no momento do processamento do mRNA ocorre splicing alternativo. Na Figura 13 (parte A) mostramos a amplificação por PCR de cada região de exon a partir do cDNA de diferentes tecidos de *R. americana*, como: corpo gorduroso (terceiro período do quarto estágio larval); glândula salivar (terceiro período); ovário (pupa); testículo (segundo, terceiro e quarto período); e em embrião (primeiro e o quinto dia do desenvolvimento). No entanto, os resultados que obtivemos de Ra-Inx2 mostram que não ocorre splicing alternativo nos tecidos estudados, desta forma todas as regiões de exons são codificadas (ver o esquema na Figura 13, parte B). Como controle, realizamos a amplificação por PCR utilizando primers mais externos da sequência para confirmar se não tem a presença de DNA genômico na amplificação do cDNA de cada tecido (Figura 14), também fizemos o PCR do cDNA em corpo gorduroso, glândula salivar e embrião que apresentou o mesmo padrão de amplificação.

CGATGCGTCGAGCTCACAGTCTCCGGGCAGGCATGAACAGTTCGCGCGAATGCAAATATAATATTA~~CTT~~GATGA  
GCCGGACTAAATTTTTTCTTATTAAAA**ATG**ATCGTAAATTCGCTAAAACCATTGGTTTATTACTTTAAATCGA  
M I V N S L K P L V Y Y F K S K  
AAAGTTTATGTATTTTCGATCCTATCTTCAAAAATGCACACGAAGTTGACCGTTTACTTTTTGTTAATATTTTC  
S L C I F D P I F K M H T K L T V Y F L L I F S  
CTTTATCATTTCCGGTCATTCATGGACTGGGAAGCCCATAGACTGCTTTATTGACAAAGAACGTAAAGCTTTT  
F I I S G H S W T G K P I D C F I D K E R K A F  
GCCGATGCATTATGTTGGGCGAATGGAACCTTACAATTGAAAACACCCCAGAACTGATGAACGGTCGACAAA  
A D A L C W A N G T F T I E N T P E L M N G R Q I  
TATTTCCGAGGCTTACCACACTATCAGCGATACTACCAATGGATCGTTATTATATTAATGGTCGAGGCTGGATT  
F R Q A Y H Y Q R Y Y Q W I V I I L M V E A G L  
GTTTTCTGTACCAGAGCGTCTGTGGAAGGCTTGGGAACATGGACGAATTCAACAGTTGTCTTCTGATCTGAAC  
F S V P E R L W K A W E H G R I Q Q L S S D L N  
GCCGATGTCATAACTTCAAATAGTGAAAATTGTGAAAAAGATAAGAAAACGAGTCTTGAGATATTTGAAGATGA  
A D V I T S N S E N C E K D K K R V L R Y L K M N  
ATAATAGTCACATACATGGGACTTACGTTTTCCGATACGTGTGCTGCGAAGTTATGAATTTCTGAACGTCGT  
N S H I H G T Y V F R Y V C C E V M N F L N V V  
TTTGAACATGTACATCTTCAACGTAATTTTCGGTCGATTCTGGAGCCGTTATTTGCCAGCAGTTTTGTCTATTA  
L N M Y I F N V I F G R F W S R Y L P A V L S L  
TTTACAACAGAAGGTCCCACATTTTCCACCTTGGCATCGGTTATATTTCCGATTACAGCCAAATGTTTCATACT  
F T T E G P T F S T L A S V I F P I T A K C S Y S  
CAGACGTTGGCCATTCTGAATCTGAGCAGTATCATGATGCTCTCTGCTTGCTTACGCTAAATGTTGTCAATGA  
D V G H S E S E Q Y H D A L C L L T L N V V N E  
AAAAGTTTTTGCATTTCTGTACATTTGGTACGTCTTGTGTTGTTTACATCGGGATTGAATTTGATTTGGCGC  
K V F A F L Y I W Y V L L L F T S G L N L I W R  
AGTTTAATTCTGTTATCGTCAACACTTCGTCTGAAAATTATTCAGTCGTCGACGAAATGGACAGAGCCACTAA  
S L I L L S S T L R L K I I Q S S T K W T E P L T  
CGGAAAATGAGGTAAAAAAGATTTTACCGAATGACAACATTGGTGACTGGTTCATTATGTTTTTGTCTCGGACA  
E N E V K K I L P N D N I G D W F I M F L L G Q  
AAATCTCAATCCGTATGCGTTCAAAGAAAATTTAGATGAGCTTTCCACAAGCAAAGAATTGTTGAATAACGAT  
N L N P Y A F K E I L D E L S T S K E L L N N D  
ATTGTT**TGA**TGGAACCTTTCATTGGGCCCAATGAAAATGCATTCATTAGCAACGCTAATTTTCAGTTACAATTCT  
I V \*  
TCAAGG

**Figura 10** – Sequência transcrita de Ra-Inx2 com sua tradução consensual. Em negrito mostrando o códon iniciador (ATG) e o último códon (TGA).

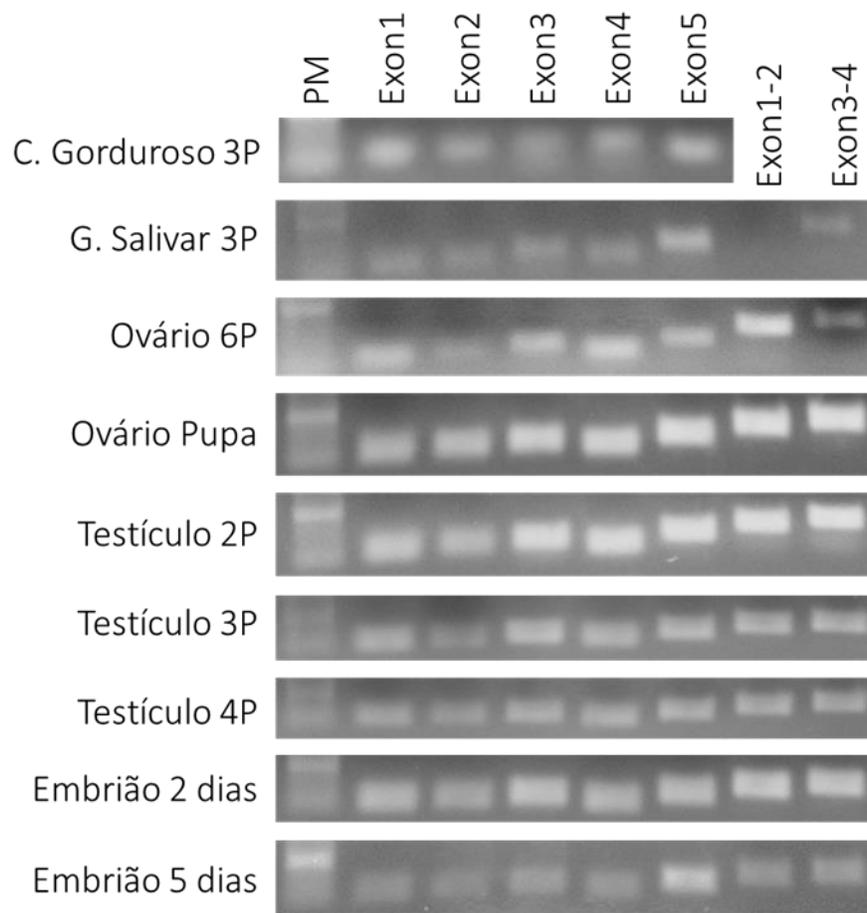


**Figura 11** – Esquema da ORF de Ra-Inx2. Fonte: NCBI, ORFfinder (2016).

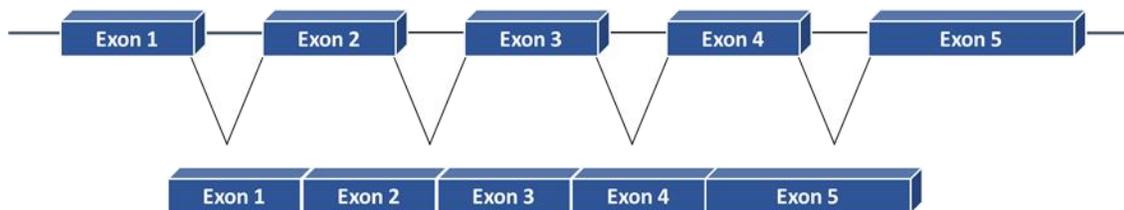


**Figura 12** – Esquema mostrando a região dos primers utilizados para amplificação de cada exon. A) Esquema mostrando a sequência genômica de Ra-Inx2 com os primers utilizados para amplificar cada exon (em azul). B) Esquema mostrando a sequência de mRNA de Ra-Inx2 com os primers utilizados para amplificar cada exon (em azul). Fonte: AcaClone, pDRAW32 (2016).

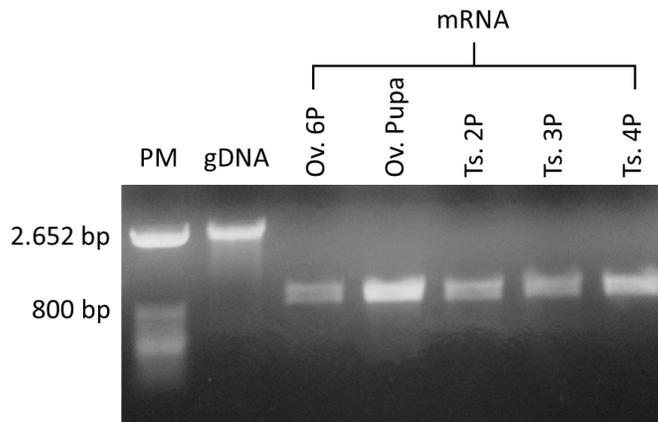
A)



B)



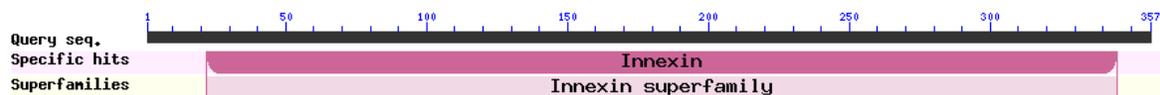
**Figura 13** – PCR amplificação do cDNA de Ra-Inx2. A) PCR mostrando a amplificação dos exons presentes na sequência de Ra-Inx2. B) Esquema mostrando a estrutura proposta da sequência mRNA de Ra-Inx2.



**Figura 14** – PCR amplificação comparando a sequência genômica com a sequência de mRNA de Ra-Inx2.

### 5.1.2 Análise da sequência putativa da proteína Ra-inx2

Com o sequenciamento do mRNA de Ra-Inx2 foi possível identificar uma ORF de 1077 nucleotídeos codificando uma proteína de 358 aminoácidos. Na Figura 15 mostramos que a sequência putativa da proteína Ra-Inx2 apresenta um domínio conservado de 320 nucleotídeos entre a superfamília das inexas.



**Figura 15** – Esquema representando o domínio conservado de Ra-Inx2. Fonte: NCBI, BLAST (2016).

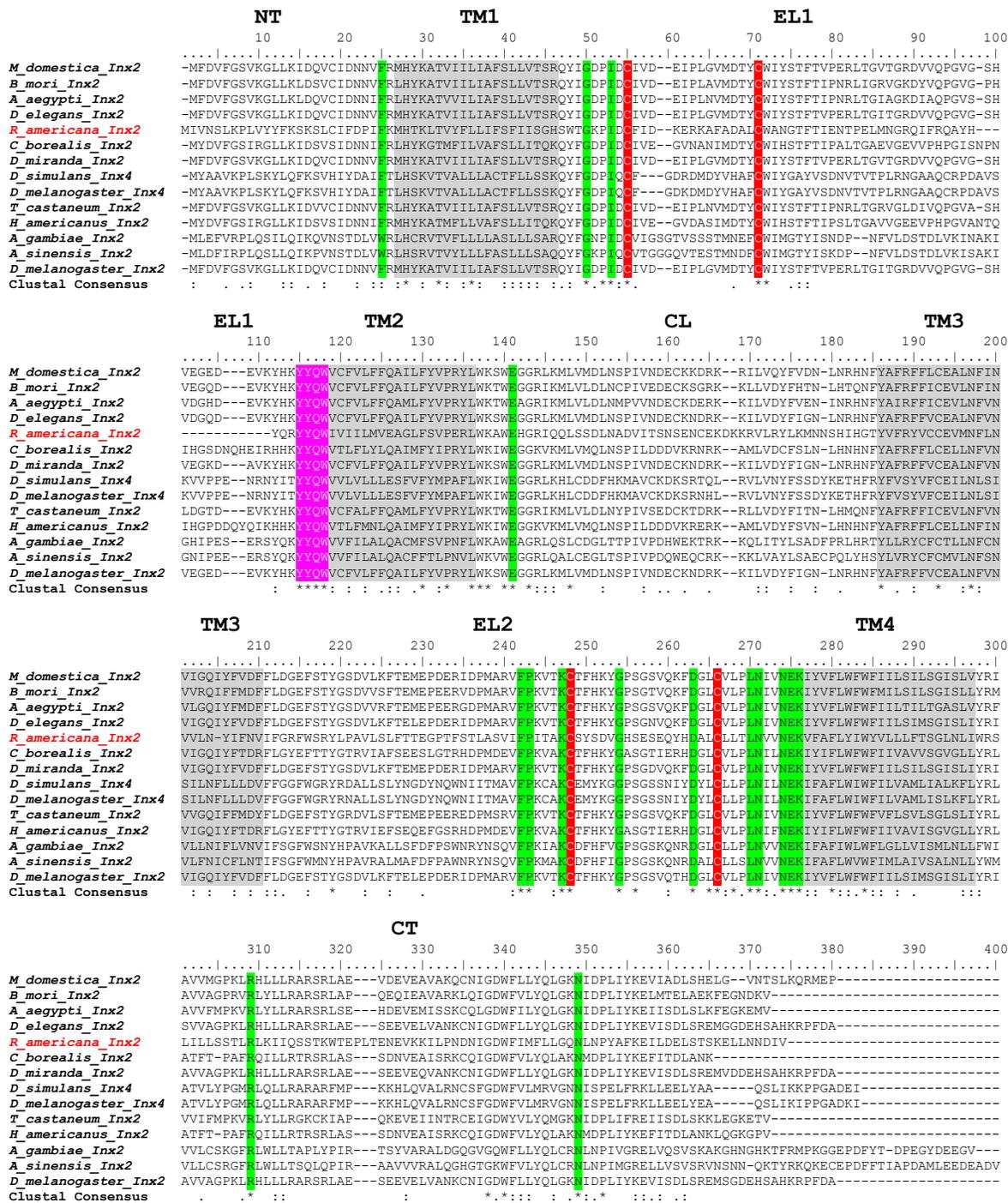
Na Figura 16 identificamos as regiões características de uma proteína de junção comunicante: os quatro domínios de transmembrana em cinza; as duas cisteínas em vermelho, que estão localizadas nas duas alças extracelulares e os resíduos de aminoácidos conservados em verde. A sequência de aminoácidos **YYQWV** destacado em rosa no início do segundo domínio transmembrana (**TM2**) são altamente conservados, sendo considerada uma assinatura entre as inexas.

No entanto, para ter um estudo mais detalhado, realizamos um alinhamento de Ra-Inx2 com as inexas de diferentes espécies (Figura 17). Identificamos a região intracelulares amino-terminal (**NT**) e carboxi-terminal (**CT**) e a alça intracelular (**CL**); regiões hidrofóbicas estão destacadas em cinza que correspondem aos quatro domínios transmembrana (**TM1**, **TM2**, **TM3** e **TM4**, respectivamente); as duas alças extracelulares (**EL1** e **EL2**) com os dois

pares de cisteínas destacados em vermelho; e os resíduos de aminoácidos conservados entre as inexas estão destacados em verde.

CGATGCGTTCGAGCTCACAGTCTCCGGGCAGGCATGAACAGTTCGCGCGAATGCAAATATAATATTACTTGATGA  
 GCCGGACTAAATTTTTTCTTATTAAAAATGATCGTAAATTCGCTAAAACCATTGGTTTATTACTTTAAATCGA  
 M I V N S L K P L V Y Y F K S K  
 AAAGTTTATGTATTTTTCGATCCTATCTTCAAAATGCACACGAAGTTGACCGTTTACTTTTTGTTAATATTTTC  
 S L C I F D P I F K M H T K L T V Y F L L I F S  
 CTTTATCATTTCCGGTCATTTCATGGACTGGGAAGCCCATAGACTGCTTTATTGACAAAGAACGTAAAGCTTTT  
 .F I I S G H S W T G K P L D C F I D K E R K A F  
 GCCGATGCATTATGTTGGGCGAATGGAACCTTACAATTGAAAACACCCCAGAACTGATGAACGGTCGACAAA  
 A D A L C W A N G T F T I E N T P E L M N G R Q I  
 TATTTCCGACAGGCTTACCACATCAGCGATACTACCAATGGATCGTTATTATATTAATGGTCGAGGCTGGATT  
 F R Q A Y H Y Q R Y Y Q W I V I I L M V E A G L  
 GTTTTCTGTACCAGCGTCTGTGGAAGGCTTGGGAACATGGACGAATTCAACAGTTGTCTTCTGATCTGAAC  
 .F S V P E R L W K A W E H G R I Q Q L S S D L N  
 GCCGATGTCATAACTTCAAATAGTGAAAATTGTGAAAAGATAAGAAAACGAGTCTTGAGATATTTGAAGATGA  
 A D V I T S N S E N C E K D K K R V L R Y L K M N  
 ATAATAGTCACATACATGGGACTTACGTTTTCCGATACGTGTGCTGCGAAGTTATGAATTTCTGAACGTCGT  
 N S H I H G T Y V F R Y V C C E V M N F L N V V  
 TTTGAACATGTACATCTTCAACGTAATTTTTCGGTCGATTCTGGAGCCGTTATTTGCCAGCAGTTTTGTCATTA  
 L N M Y I F N V I F G R F W S R Y L P A V L S L  
 TTTACAACAGAAGGTCCCACATTTTCCACCTTGGCATCGGTTATATTTCCGATTACAGCCAAATGTTTACTACT  
 F T T E G P T F S T L A S V I F P I T A K C S Y S  
 CAGACGTTGGCCATTCTGAATCTGAGCAGTATCATGATGCTCTCTGCTTGCTTACGCTAAATGTTGTCAATGA  
 D V G H S E S E Q Y H D A L C L L T L N V V N E  
 AAAAGTTTTTGCATTTCTGTACATTTGGTACGTCTTGTGTTGTTTCACATCGGGATTGAATTTGATTTGGCGC  
 K V F A F L Y I W Y V L L L F T S G L N L I W R  
 AGTTTAATTCTGTTATCGTCAACACTTCGTCTGAAAATTATTTCAGTCGTCGACGAAATGGACAGAGCCACTAA  
 S L I L L S S T L R L K I I Q S S T K W T E P L T  
 CGGAAAATGAGGTAAAAAAGATTTTACCGAATGACAACATTGGTGACTGGTTTATTATGTTTTTGTCTCGGACA  
 E N E V K K I L P N D N I G D W F I M F L L G Q  
 AAATCTCAATCCGTATGCGTTCAAAGAAATTTAGATGAGCTTTCCACAAGCAAAGAATTGTTGAATAACGAT  
 N L N P Y A F K E I L D E L S T S K E L L N N D  
 ATTGTTTGAATGGAACCTTTTATTGGGCCCAATGAAAATGCATTCATTAGCAACGCTAATTTTTCAGTTACAATTCT  
 I V \*  
 TCAAGG

**Figura 16** – Sequência de mRNA de Ra-Inx2 com a tradução consenso da proteína. Os quatro domínios transmembrana (TM1, TM2, TM3 e TM4) estão destacados em cinza. No início do segundo domínio transmembrana a sequência de aminoácidos altamente conservados YYQW estão destacados em rosa. As duas cisteínas localizadas nas duas alças extracelulares (EL1 e EL2) estão destacadas em vermelho. Os resíduos de aminoácidos conservados estão destacados em verde. A região promotora está sublinhada no início da sequência. E o códon iniciador (ATG) e o último códon (TGA) estão destacados em negro.



**Figura 17** – Imagem do alinhamento da sequência consenso da proteína Ra-Inx2 as inexas de outras espécies. A sigla NT representa a região amino-terminal; em cinza destacam-se os quatro possíveis domínios transmembrana (TM1, TM2, TM3 e TM4); a siglas EL1 e EL2 representam as regiões das alças extracelulares, onde estão localizadas as duas cisteínas em vermelho; a sigla CL representa a região da alça intracelular; e a sigla CT representa a região carboxi-terminal. No início do segundo domínio transmembrana a sequência de aminoácidos altamente conservados YYQW estão destacados em rosa. Os resíduos de aminoácidos conservados estão destacados em verde. Fonte: Larkin et al., ClustalX (2007).

Para obtenção dos valores de identidade e similaridade entre a sequência de Ra-Inx2 comparamos com a sequência de inexina-2 de outros organismos disponíveis no banco de dados internacional NCBI. O termo identidade refere-se ao número de aminoácidos idênticos e o termo similaridade refere-se ao número de aminoácidos com propriedades químicas semelhantes. Na Tabela 4 apresentamos os valores obtidos de cada organismo. Os valores obtidos foram parecidos comparando diferentes organismos, mantendo uma média de aproximadamente 34,1% de identidade e 55,1% de similaridade. Identificamos também que os organismos que tem uma sequência mais semelhante são da espécie *Anopheles gambiae*.

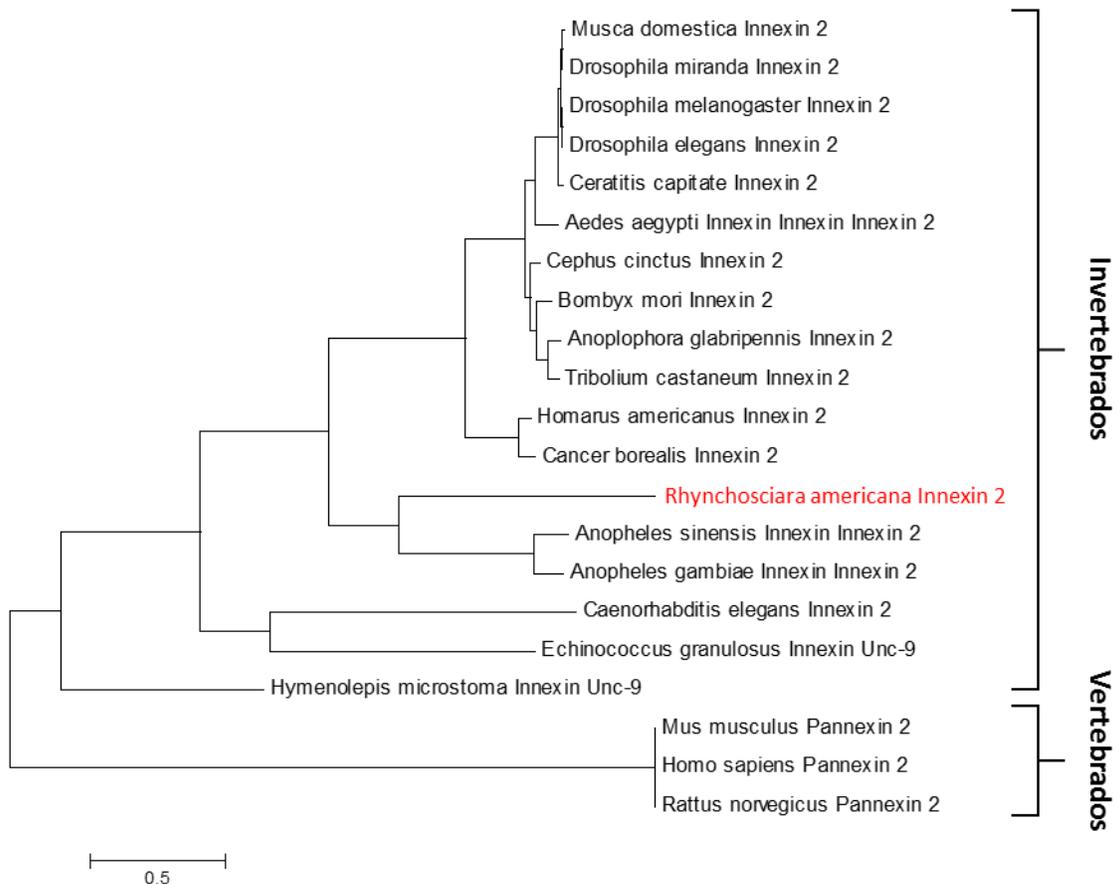
Nome das espécies	Identidade	Similaridade
<i>Anopheles gambiae</i> – Inx2	37%	58%
<i>Musca domestica</i> – Inx2	34%	56%
<i>Anopheles sinensis</i> – Inx2	34%	56%
<i>Drosophila melanogaster</i> - Inx2	34%	55%
<i>Aedes aegypti</i> – Inx2	34%	54%
<i>Drosophila elegans</i> – Inx2	34%	54%
<i>Drosophila 45icróst</i> – Inx2	33%	55%
<i>Bombyx mori</i> – Inx2	33%	53%

**Tabela 4** – Valores em (%) de identidade e similaridade de Ra-Inx2 versus outros organismos. Os valores de identidade e similaridade foram obtidos do GenBank no site no NCBI.

Com base na sequência de aminoácidos de Ra-Inx2 utilizamos o programa MEGA 6 para construir uma árvore filogenética (Figura 18) com o método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood). A história evolutiva foi inferida utilizando modelo de JTT (Jones et al., 1992). Os dados obtidos foram gerados automaticamente com base nos algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos dos ramos medidos com base no número de substituições por sítio. A análise envolveu 21 sequências de aminoácidos disponíveis no banco de dados internacional NCBI.

Identificamos que Ra-Inx2 está agrupado com os das inexinas de outros artrópodes e principalmente com os dípteros da família Culicidae, como *A. gambiae* e *A. sinensis*, corroborando com os valores obtidos de identidade e similaridade. Para as análises utilizamos principalmente a sequência de inexina-2 de diferentes invertebrados, sendo que nos vertebrados utilizamos a sequência da proteína panexina-2. Os grupos externos foram separados de duas formas: o primeiro grupo é de invertebrados que não pertencem ao filo Arthropoda, como o nematoide *Caenorhabditis elegans* e os platelmintos *Echinococcus*

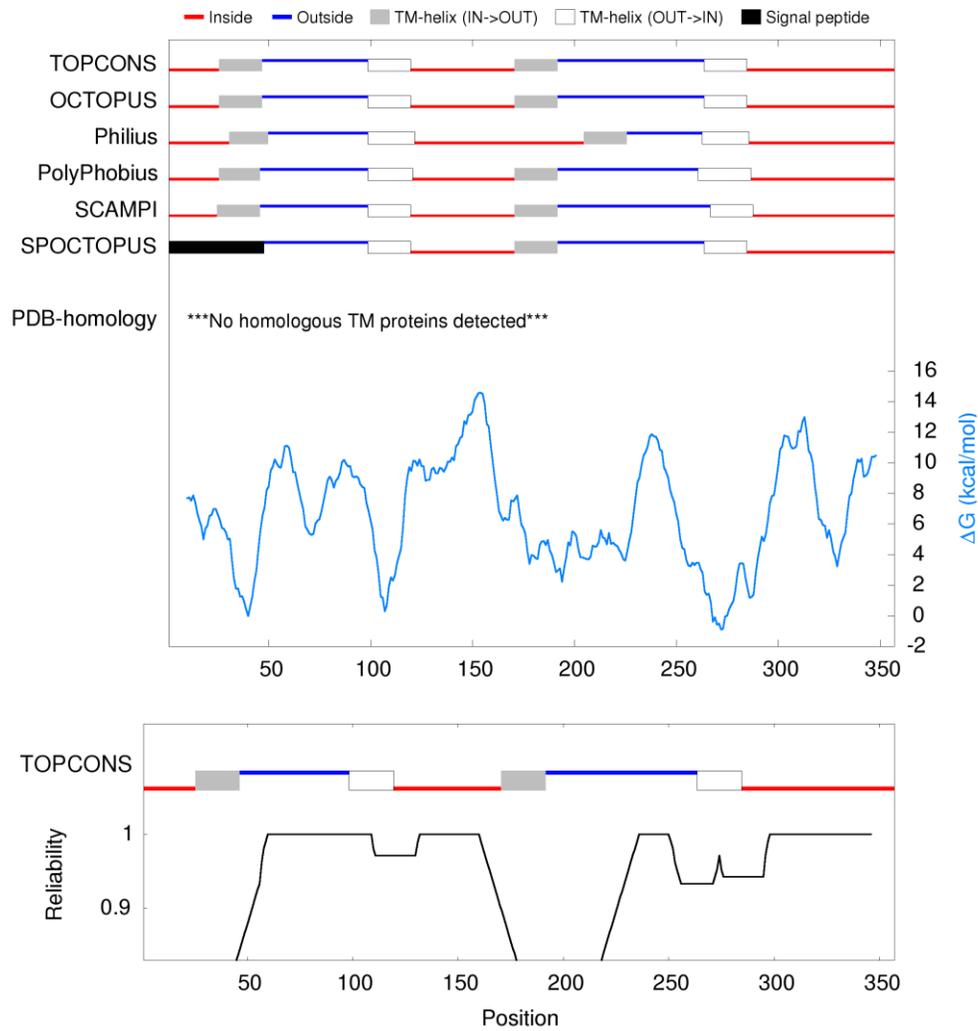
*granulosus* e *Hymenolepis 46icróstoma*. O segundo grupo inclui os vertebrados como *Homo sapiens* e os roedores *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*.



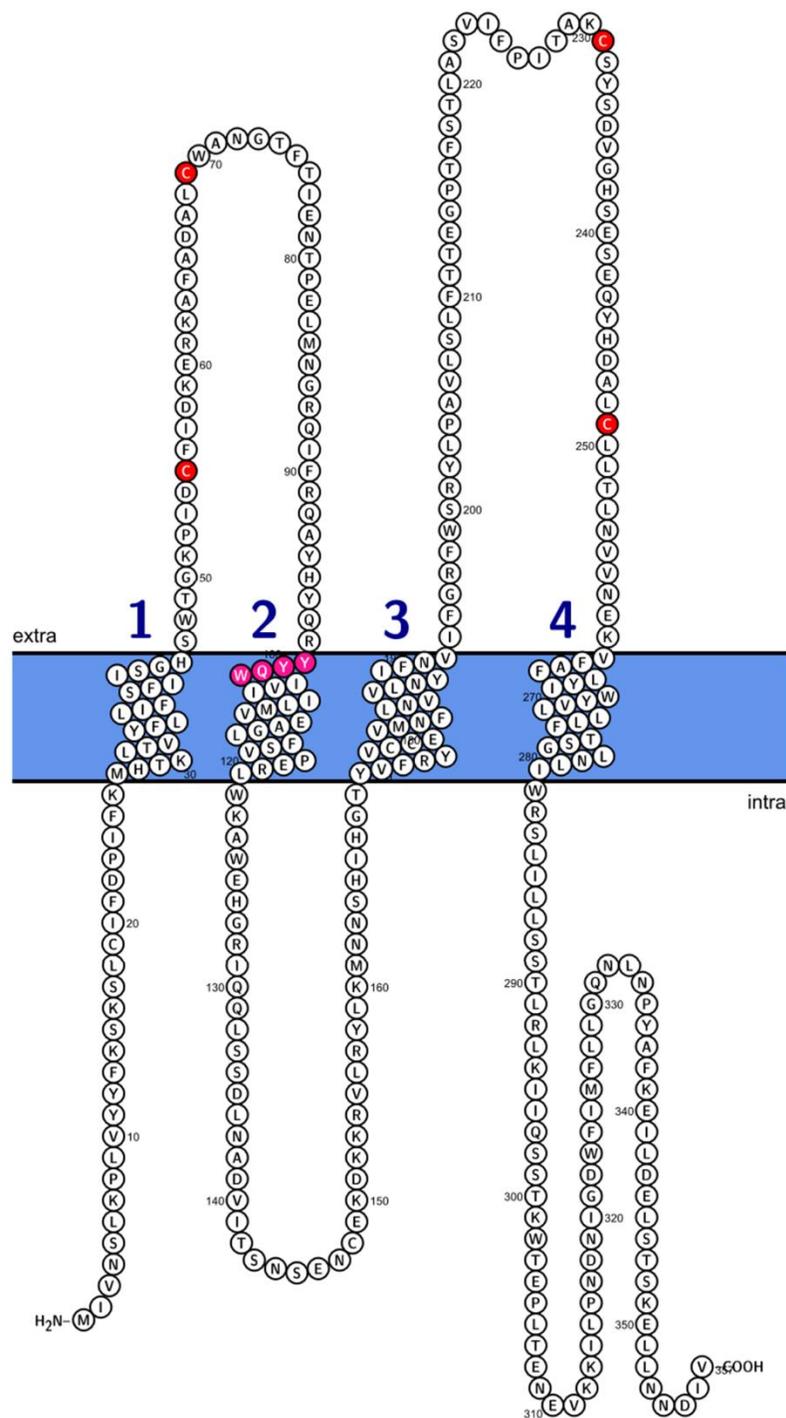
**Figura 18** – Análise filogenética comparando a sequência da proteína Ra-Inx2 com a sequência de inexas de outras espécies. Árvore obtida pelo método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood). A história evolutiva foi inferida utilizando modelo de JTT (Jones et al., 1992). Os dados obtidos foram gerados automaticamente com base nos algoritmos de Neighbor-Joining e BioNJ. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos dos ramos medidos com base no número de substituições por sítio. A análise envolveu 21 sequências de aminoácidos. Fonte: Tamura et al., MEGA 6 (2013). Data 21/10/2016.

A partir da sequência putativa da proteína utilizamos o programa Topcons para confirmar a estrutura de membrana de Ra-Inx2 (ver o gráfico na Figura 19), sendo que o valor de  $\Delta G$  avalia a distância de cada resíduo de aminoácido em relação a membrana. No gráfico estão destacadas as três regiões intracelulares em vermelho (inside), que correspondem: a região amino-terminal (**NT**); a alça intracelular (**CL**); e a extremidade carboxi-terminal (**CT**). Em azul (outside) estão destacadas as duas regiões extracelulares que correspondem as duas alças extracelulares **EL1** e **EL2** respectivamente. Os quatro domínios transmembrana também estão destacados, sendo que **TM1** e **TM3** em cinza (TM-helix IN->OUT) e **TM2** e **TM4** em branco (TM-helix OUT->IN). Na Figura 20 mostramos a topologia de membrana da proteína Ra-Inx2, sendo que as TMs estão destacadas numericamente em azul, as cisteínas estão localizadas nas duas alças extracelulares em vermelho e a sequência conservada **YYQW** está destacado em rosa no início do segundo domínio transmembrana (**TM2**).

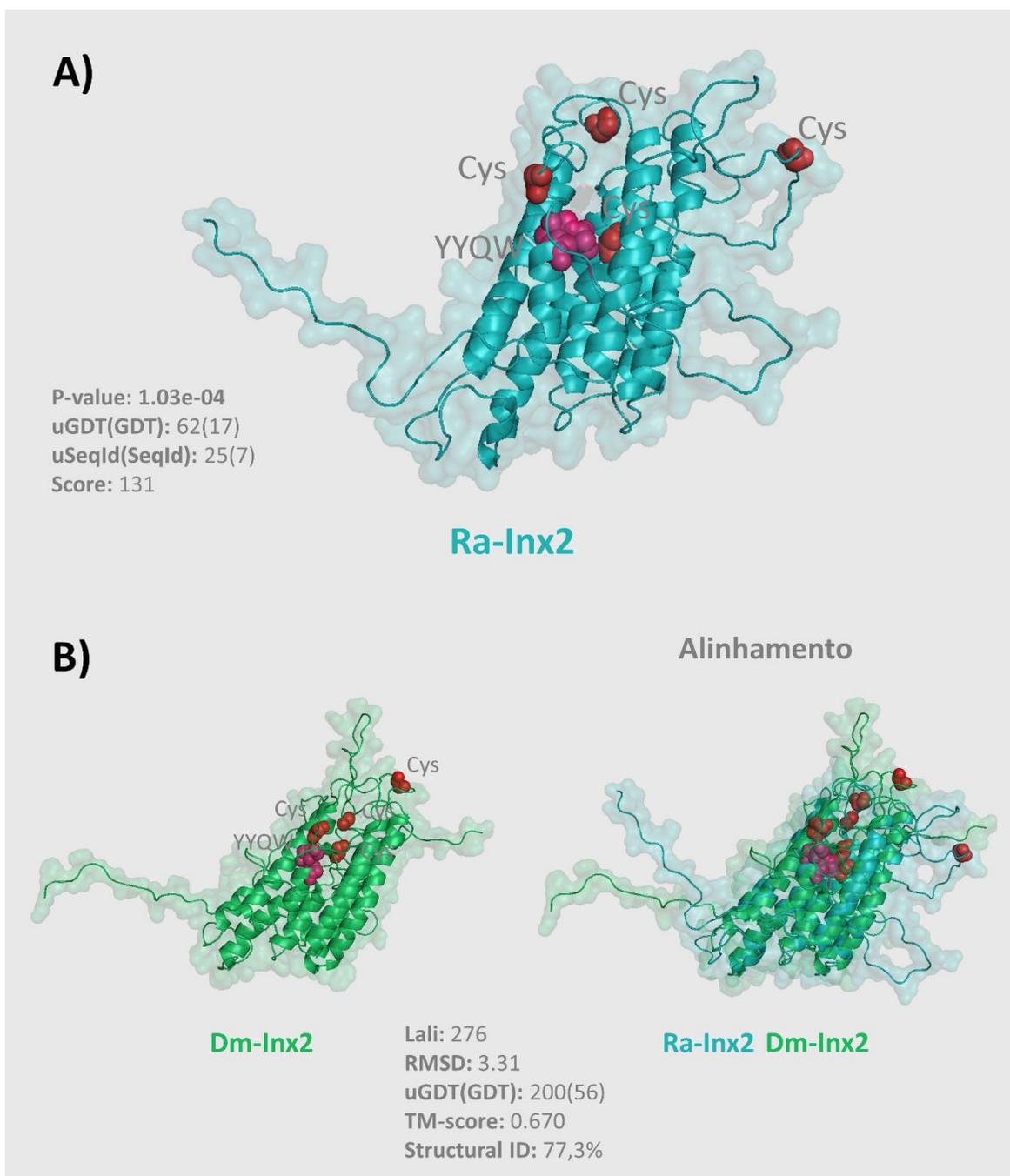
Na Figura 20 mostramos a predição da proteína Ra-Inx2 gerada a partir da sequência putativa de aminoácidos, sendo que em vermelho destacamos os resíduos de cisteínas localizados nas alças extracelulares e em rosa a sequência conservada **YYQW**. Na figura é possível observar também os domínios em alfa-hélice que correspondem aos domínios transmembrana <sup>TM</sup>. A partir da predição da estrutura da proteína Ra-Inx2, fizemos um alinhamento com a proteína Dm-Inx2 de *D. melanogaster* (ver na Figura 20, parte B). O alinhamento apresentou identidade de 77,3% e Tmscore de 0.670 confirmando que as duas proteínas têm dobras semelhantes. Para adquirir o valor de identidade (Structural ID) calculamos com base no valor de Lali (length of alignment) no qual mostra o número de aminoácidos totalmente alinhados.



**Figura 19** – Gráfico mostrando a possível estrutura de Ra-Inx2 em relação a membrana. As regiões intracelulares (inside) estão destacadas em vermelho e as regiões extracelulares (outside) estão destacadas em azul. Os quatro domínios transmembrana estão destacados nas caixas de cor cinza e branco respectivamente. Fonte: Bernsel et al., Topcons (2009).



**Figura 20** – Estrutura topológica de Ra-Inx2. Os quatro domínios transmembrana estão destacados numericamente em azul, os dois pares de cisteínas localizados nas alças extracelulares estão destacados em vermelho e a sequência conservada YYQW está destacada em rosa no início do segundo domínio transmembrana (TM2). Fonte: Omasits et al., Protter (2014).



**Figura 21** – Predição da proteína Ra-Inx2 A) Predição da proteína Ra-Inx2 de *R. americana*, mostrando a região conservada YYQW em rosa e os dois pares de cisteínas (Cys) localizados nas duas alças extracelulares em vermelho. B) Alinhamento de Ra-Inx2 com predição da proteína Dm-Inx2 de *D. melanogaster*. Fonte: Källberg et al., RaptorX (2012).

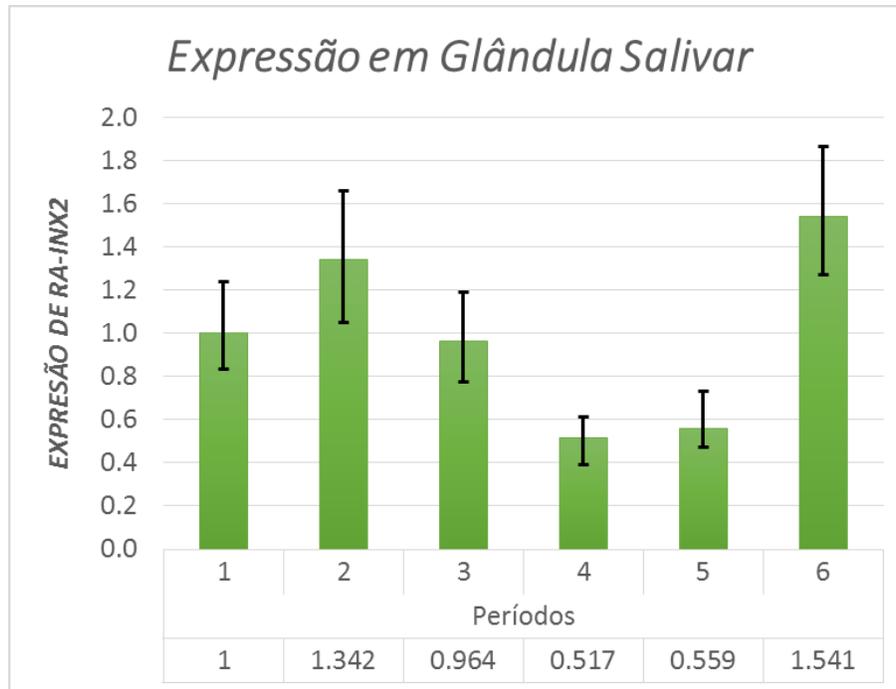
## 5.2 Perfil de expressão de Ra-Inx2

Com o objetivo de analisar quantitativamente a expressão do mRNA de Ra-Inx2 realizamos qPCR durante o desenvolvimento de *R. americana* nos seguintes tecidos: glândula salivar, corpo gorduroso, ovário, testículo e durante o desenvolvimento embrionário. Nós também realizamos uma análise comparativa entre os níveis de expressão de Ra-Inx2 e Ra-Inx7. Para análise Ra-Inx2 foi utilizado como calibrador. Os primers quantitativos foram desenhados a partir da sequência de mRNA de Ra-Inx2 e Ra-Inx7 (Tabela 1).

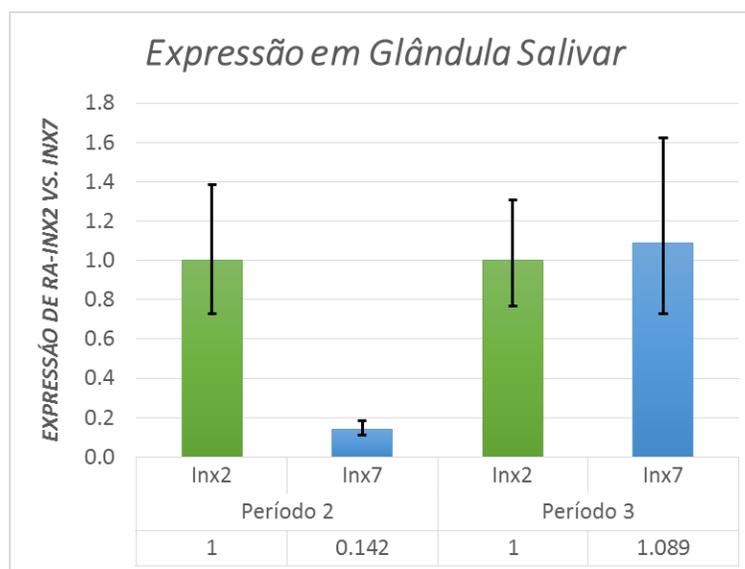
### 5.2.1 Níveis de expressão em glândula salivar

A glândula salivar de *R. americana* é um órgão usado como marcador cromossômico e apresenta grandes proporções na larva (Machado-Santelli, Basile de 1975; Pavan, Breuer, 1952). Fisiologicamente tem um papel fundamental no desenvolvimento, participando ativamente da construção do casulo comunitário (Winter et al., 1977). Estruturalmente o órgão é dividido em três regiões, sendo S1 proximal; S2 medial e S3 distal (Pavan, 1965).

Em glândula salivar realizamos a análise do perfil de expressão em relação ao primeiro período do quarto estágio larval do desenvolvimento (Figura 22). No sexto período de desenvolvimento ocorreu o maior nível de expressão de Ra-Inx2, chegando a 1,5 vezes em relação ao primeiro período. Na Figura 23 mostramos a expressão comparativa em glândula salivar de Ra-Inx2 e Ra-Inx7 durante o segundo e o terceiro período do quarto estágio larval do desenvolvimento e pudemos observar que no segundo período ocorre uma expressão significativa de Ra-Inx2 em comparação com Ra-Inx7. No segundo período as larvas adquirem uma coloração avermelhada devido a pigmentação da hemolinfa. No terceiro período a expressão entre estas duas inexas manteve-se praticamente equivalente.



**Figura 22** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão de Ra-Inx2 em glândula salivar ao longo do quarto estágio larval de desenvolvimento de *R. americana*.

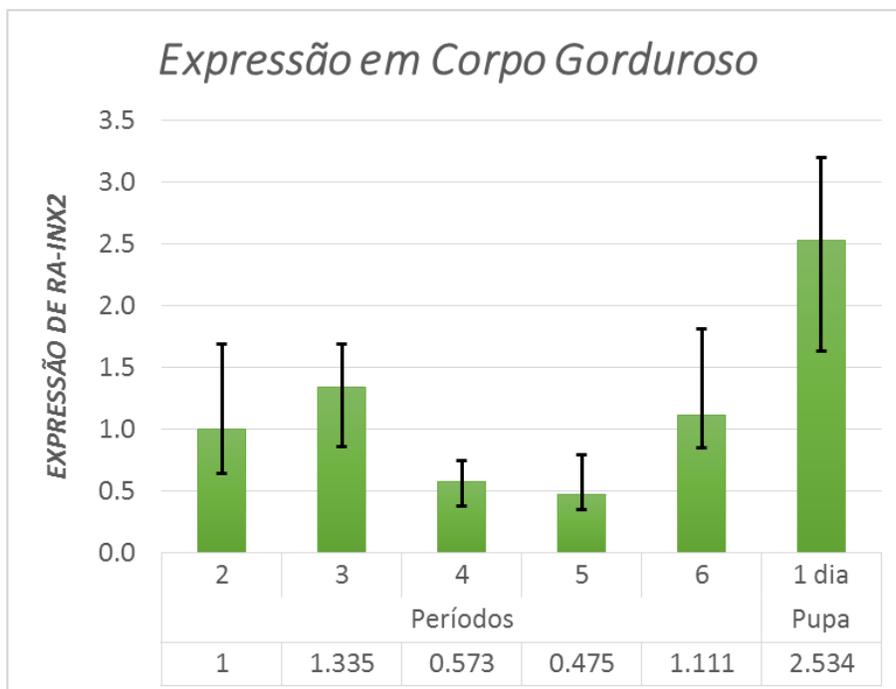


**Figura 23** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão comparativa entre Ra-Inx2 e Ra-Inx7 em glândula salivar durante o segundo período e o terceiro período respectivamente do quarto estágio larval do desenvolvimento de *R. americana*.

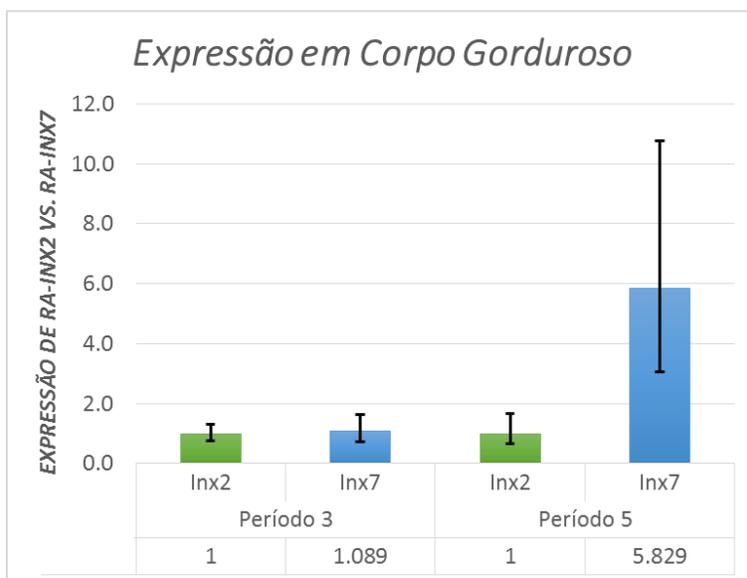
### 5.2.2 Níveis de expressão em corpo gorduroso

O corpo gorduroso é um órgão que faz parte do metabolismo intermediário em insetos, participando da nutrição. Morfologicamente, é um órgão com aspecto de “folha de papel” apresentando uma única camada de células. No período larval, as células apresentam uma forma achatada e estão intimamente ligadas entre si. Durante os estágios larvais este órgão passa por diversas modificações morfológicas. No início, ele possui uma única camada de células e ocupa a maior parte da extensão da larva; no final da fase larval, ele torna-se quebradiço e em pupa de quatro dias as células estão sendo remodeladas (Brandão et al., 2014).

No corpo gorduroso o segundo período do desenvolvimento foi utilizado como calibrador (Figura 24). No sexto período, também conhecido como pré-pupa, a expressão de Ra-Inx2 começa a aumentar e tem uma máxima expressão em pupa de 2,5 vezes em relação ao segundo período. Na Figura 25 observamos que a expressão comparativa durante o terceiro período do desenvolvimento de *R. americana* manteve-se equivalente nas duas inexas, sendo que no quinto período do desenvolvimento a expressão de Ra-Inx7 teve um aumento significativo de 5,8 vezes em relação a Ra-Inx2. No quinto período ocorre o aparecimento do pufe C3.



**Figura 24** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão de Ra-Inx2 em corpo gorduroso ao longo do quarto estágio larval de desenvolvimento e estágio de pupa de *R. americana*.

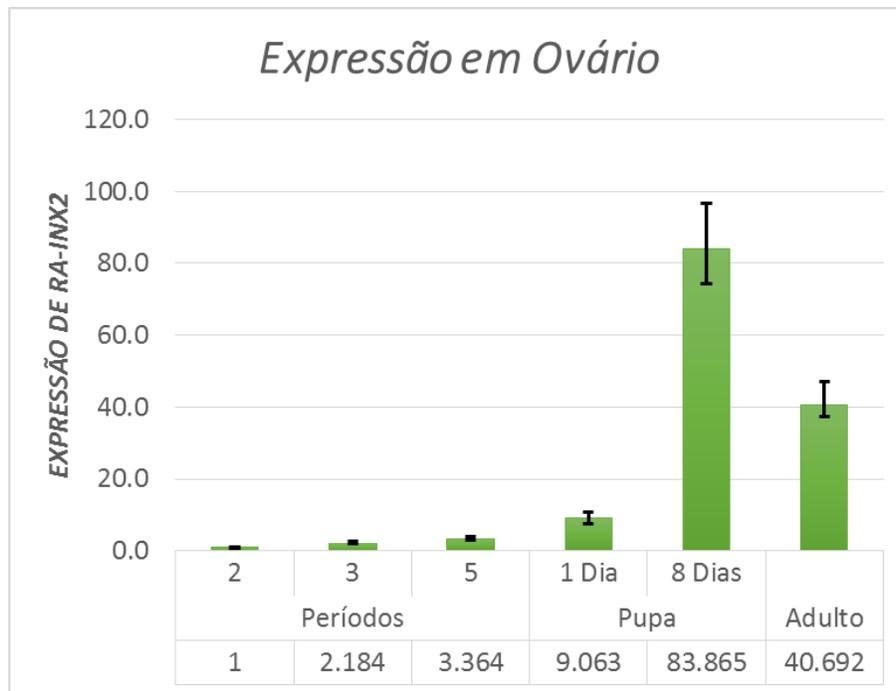


**Figura 25** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão comparativa entre Ra-Inx2 e Ra-Inx7 em corpo gorduroso durante o terceiro período e o quinto período respectivamente do quarto estágio larval do desenvolvimento de *R. americana*.

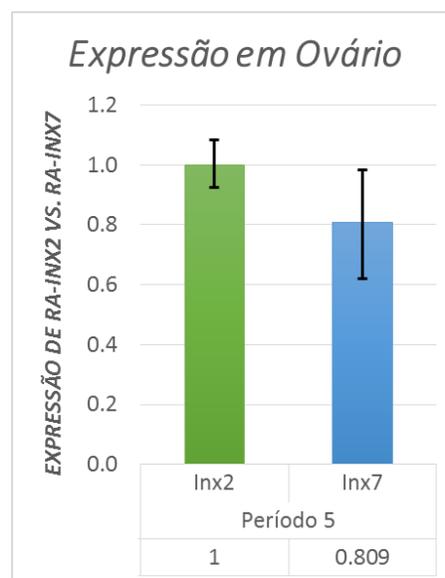
### 5.2.3 Níveis de expressão em ovário

O ovário de *R. americana* apresenta características próprias, diferente de *Drosophila* em que o ovócito é nutrido por 15 células nutridoras (Home-Badovinac e Bilder, 2005). Em *R. americana* cada folículo ovariano se desenvolve sincronicamente e apresenta apenas uma gigante célula nutridora junto ao ovócito. O folículo ovariano se desenvolve a partir das células germinativas primordiais que vão se diferenciar em células-tronco germinativas, depois de algumas divisões mitóticas tornam-se células germinativas (Basile, 1979). A última divisão mitótica das células germinativas ocorre logo no início da vida larval dando origem a duas células com diferentes destinos: o ovócito, entra em meiose e para em zigóteno, enquanto que a célula nutridora, sofre processos de poliploidia e politenia (Basile, 1979).

Em ovário observamos que a expressão aumenta gradativamente durante os períodos de desenvolvimento larval (Figura 26). No quinto período a expressão chega a estar aumentada 3,3 vezes em relação ao segundo período. No entanto, em pupa é onde ocorre um aumento significativo da expressão, sendo que em pupa de oito dias de desenvolvimento ocorre máxima expressão de 83,8 vezes em relação ao segundo período do desenvolvimento. Na expressão comparativa em ovário observamos que Ra-Inx2 teve maior nível de expressão durante o quinto período de desenvolvimento em relação a Ra-Inx7 (Figura 27).



**Figura 26** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão de Ra-Inx2 em ovário ao longo do quarto estágio larval de desenvolvimento, estágio de pupa e adultos de *R. americana*.

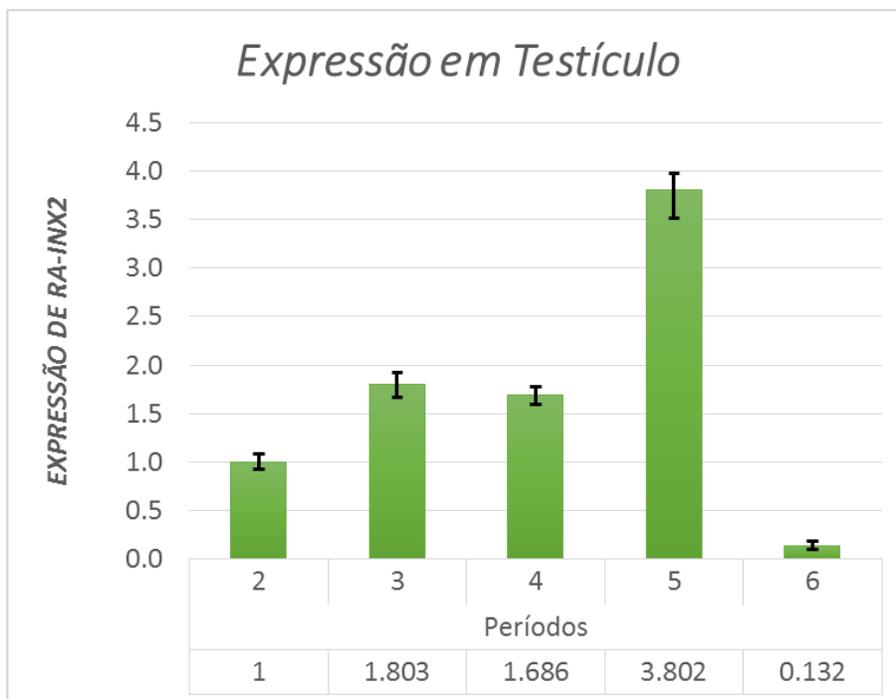


**Figura 27** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão comparativa entre Ra-Inx2 e Ra-Inx7 em ovário durante o quinto período do quarto estágio larval do desenvolvimento de *R. americana*.

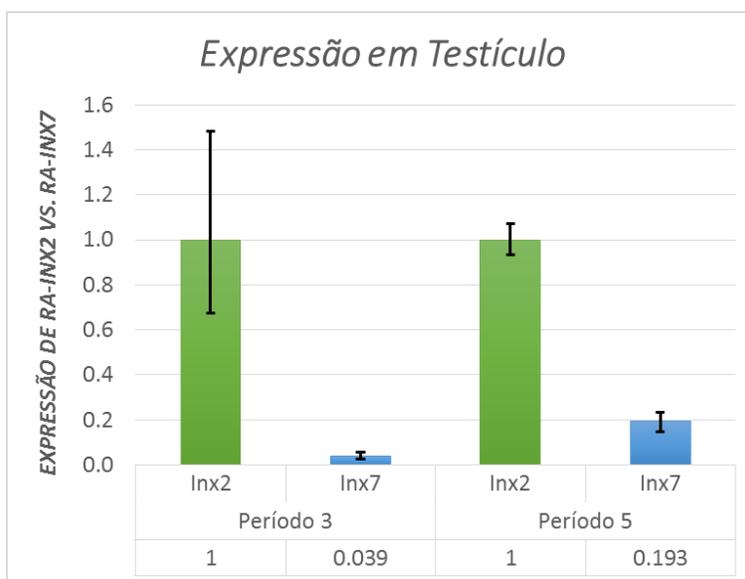
#### 5.2.4 Níveis de expressão em testículo

Diferente do ovário de *R. americana* em que os cromossomos do ovócito estão parados em meiose e são funcionalmente pouco ativos, pois a síntese do RNA ocorre na célula nutridora e nas células foliculares, no testículo o processo é mais dinâmico, a fase de crescimento da última espermatogônia até o espermatócito-I é bastante longa e se inicia em larvas de aproximadamente 30 dias de idade. No estágio pré-meiótico que os cromossomos se duplicam, sendo que neste estágio os cromossomos estão muito ativos na síntese de RNA. Depois da duplicação do DNA cromossômico na fase pré-meiótica, a meiose se inicia em prófase-I com a condensação dos cromossomos, as demais fases são bastante rápidas ocorrendo de 2 a 3 dias no terceiro período do desenvolvimento larval (Basile et al, 1974).

A expressão gênica de Ra-Inx2 em testículo observamos um aumento gradativo durante o desenvolvimento de *R. americana* (Figura 28). O quinto período apresentou maior nível de expressão estando 4,9 vezes maior em relação ao segundo período. Logo após, no sexto período ocorre uma diminuição significativa da expressão. Os resultados comparativos que obtivemos em testículo mostram que os níveis de Ra-Inx2 são significativamente maiores nos dois períodos estudados (Figura 29). No terceiro período de desenvolvimento larval de *R. americana* não ocorre expressão de Ra-Inx7, neste período as larvas estão formando a rede que dará origem ao casulo comunitário. No quinto período, a expressão de Ra-Inx2 esteve 5 vezes maior do que Ra-Inx7.



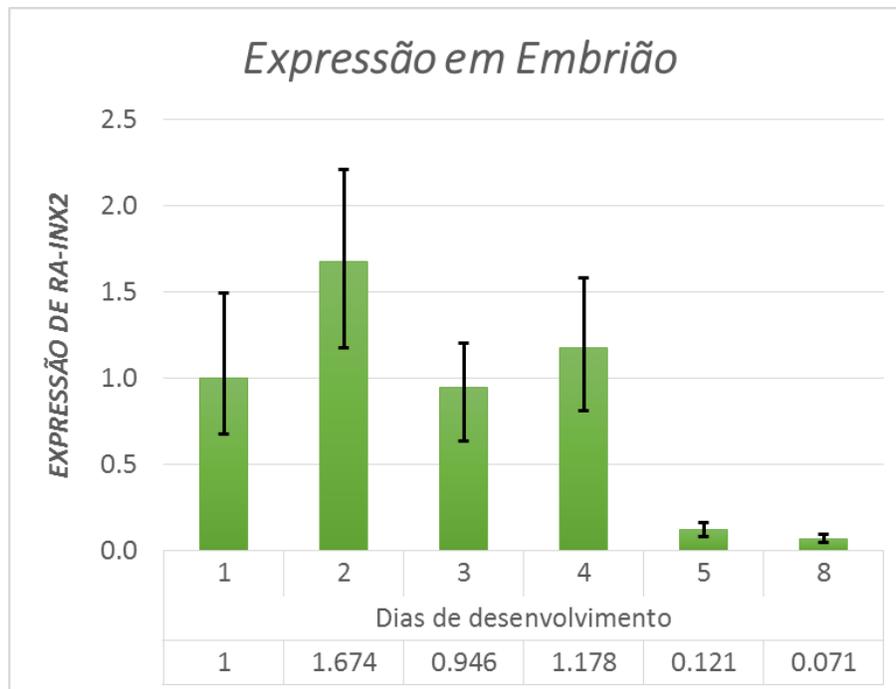
**Figura 28** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão de Ra-Inx2 em testículo ao longo do quarto estágio larval de desenvolvimento de *R. americana*.



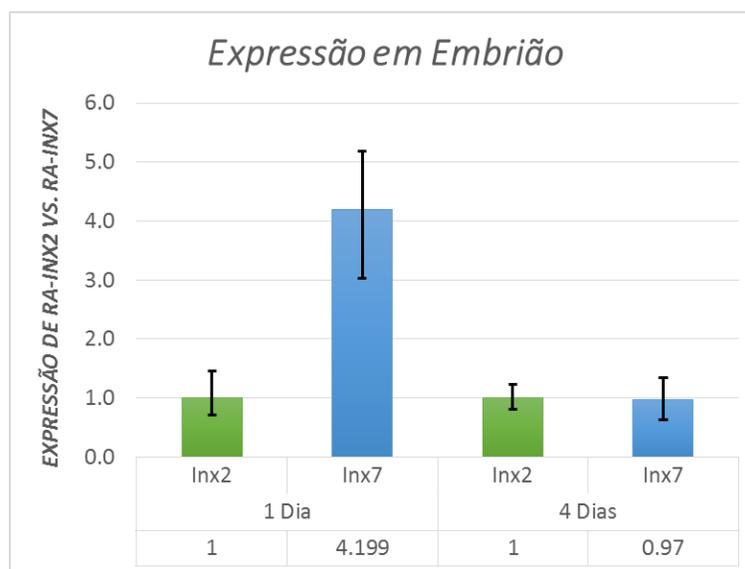
**Figura 29** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão comparativa entre Ra-Inx2 e Ra-Inx7 em testículo durante o terceiro período e o quinto período respectivamente do quarto estágio larval do desenvolvimento de *R. americana*.

### 5.2.5 Níveis de expressão em embrião

O desenvolvimento embrionário é caracterizado por ser constituído por células jovens de linhagem somática e germinativa. Na Figura 30 observamos que a expressão de Ra-Inx2 durante o desenvolvimento embrionário, sendo que ocorreu em maiores níveis de expressão nos quatro primeiros dias de desenvolvimento, sendo que no segundo dia observamos maior nível de expressão, estando 1,6 vezes maior em relação ao primeiro dia de desenvolvimento. Na análise comparativa do desenvolvimento embrionário de *R. americana* observamos que Ra-Inx7 foi significativamente mais expressa do que Ra-Inx2 durante o primeiro dia de desenvolvimento, sendo considerado 4,2 vezes mais expresso que Ra-Inx2 (Figura 31). No quarto dia de desenvolvimento a expressão entre as duas inexas tiveram níveis de expressão semelhantes.



**Figura 30** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão de Ra-Inx2 durante o desenvolvimento embrionário de *R. americana*.



**Figura 31** – Gráfico de qPCR mostrando a expressão comparativa entre Ra-Inx2 e Ra-Inx7 durante o primeiro e quarto dia de desenvolvimento embrionário de *R. americana*.

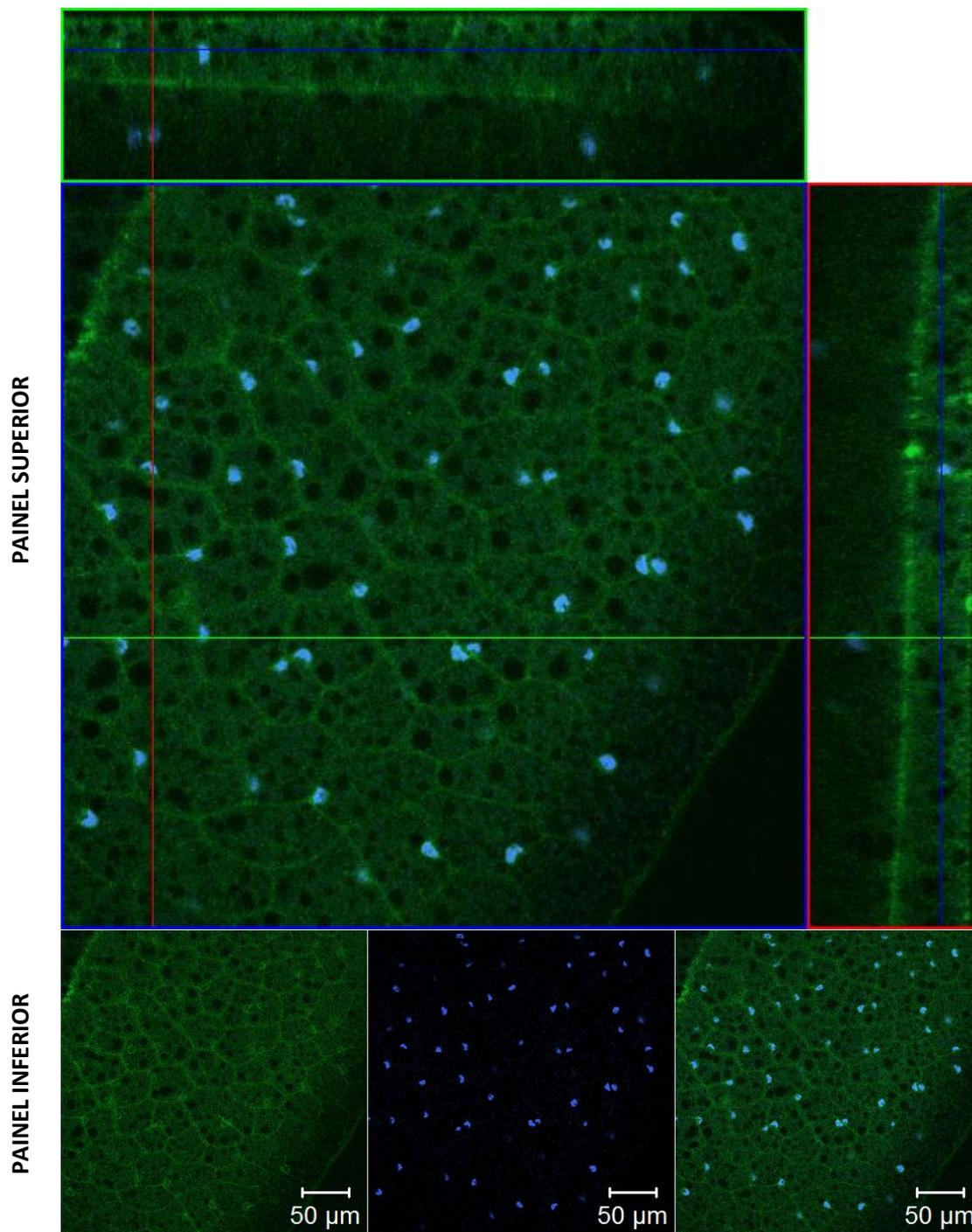
### 5.3 Localização celular de Ra-Inx2

Com o objetivo de identificar a localização celular da proteína Ra-Inx2 realizamos ensaio de imunolocalização nos seguintes tecidos: corpo gorduroso, ovário e testículo. O corpo gorduroso coletamos no terceiro período do quarto estágio larval do desenvolvimento e provável marcação da proteína Ra-Inx2 (em verde) está principalmente localizada entre as células do corpo gorduroso, sendo que o núcleo está marcado em azul (Figura 32).

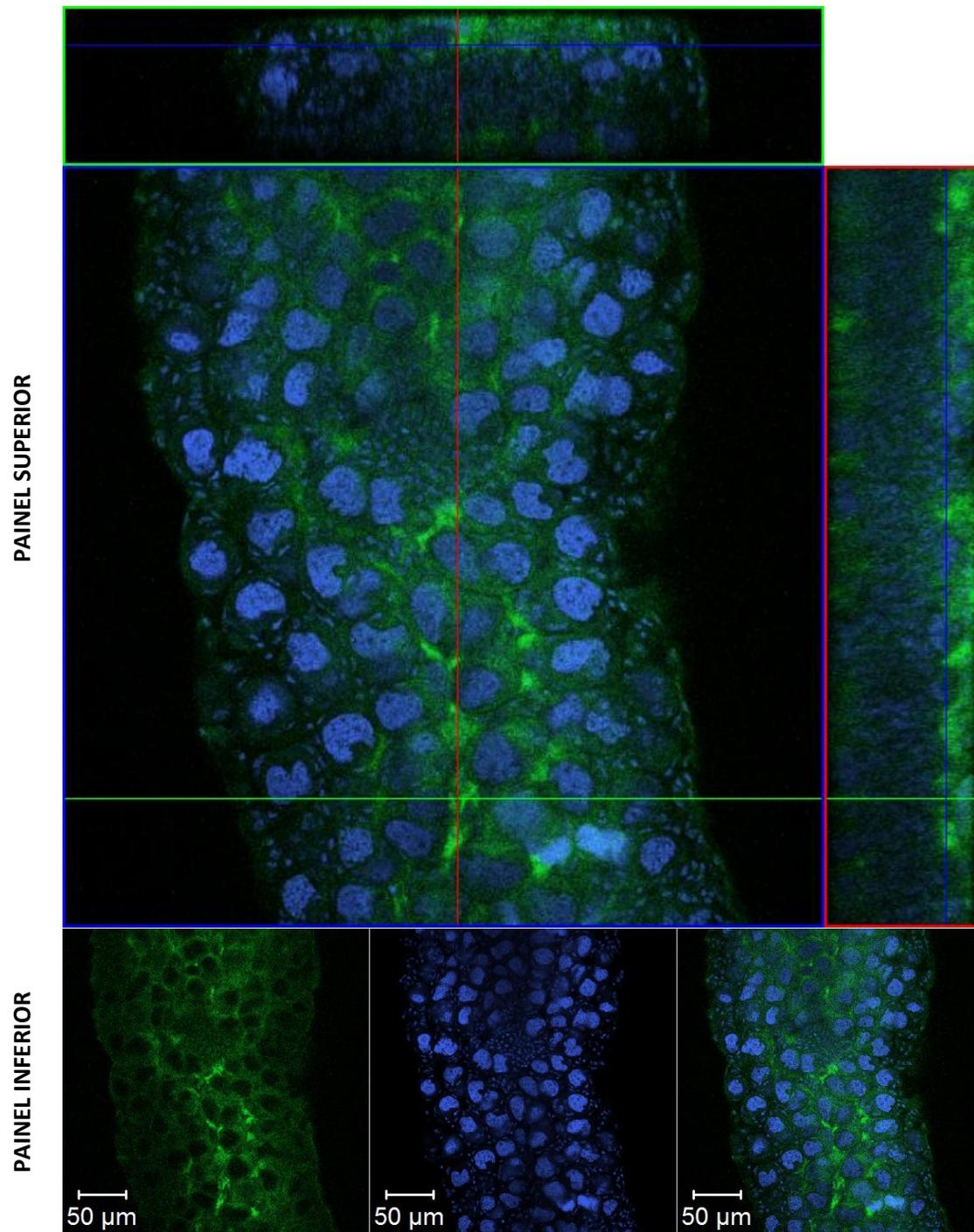
Coletamos o ovário no quinto período do desenvolvimento e na fase de pupa. No quinto período do desenvolvimento e em pupa a proteína Ra-Inx2 (em verde) está provavelmente localizada nas células de linhagem somáticas entre os folículos (Figura 33 e 34), sendo que em pupa é possível observar também a marcação de Ra-Inx2 nos hemócitos localizados ao redor do ovário (Figura 35). Os hemócitos estão presentes na hemolinfa e aderem a superfície do ovário no momento da preparação.

Por fim, coletamos o testículo no terceiro período e no quinto período do quarto estágio do desenvolvimento. Durante o terceiro período o processo de espermatogênese está em uma fase crítica, pois neste período as células de linhagem germinativa estão passando pelo processo de meiose e ocorre sequencialmente as etapas: metáfase I; anáfase I e eliminação cromossômica para formação do corpúsculo polar; metáfase II; anáfase II e eliminação cromossômica para formação de outro corpúsculo polar; e formação da espermátide (Basile et al., 1974). Nos dois períodos estudados em testículo observamos a provável marcação de Ra-Inx2 (em verde) entre os espermatócitos (células de linhagem germinativa), sendo que o núcleo está marcado em azul (ver nas Figuras 36 e 37).

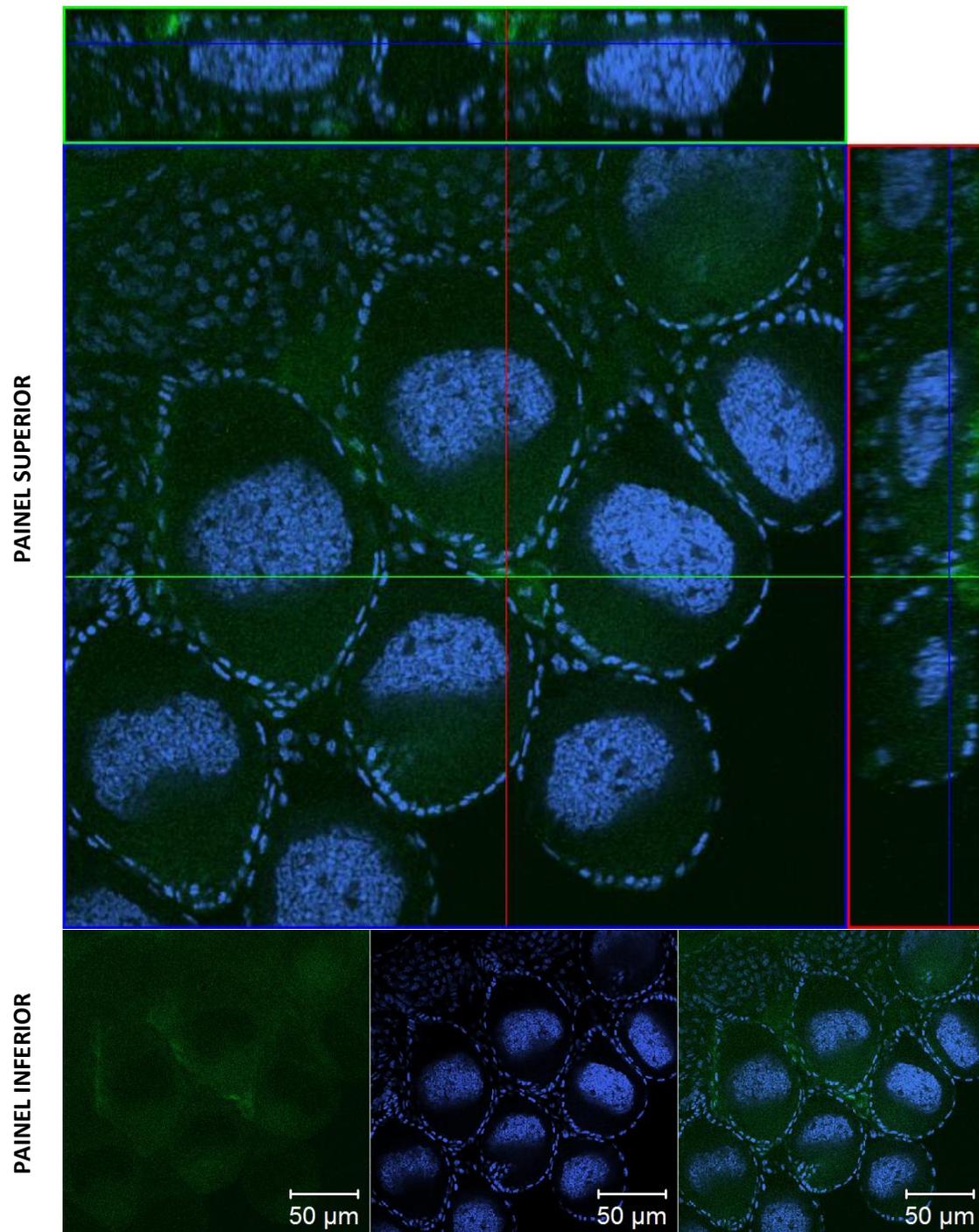
Como controle realizamos o ensaio de imunolocalização com a marcação de actina e  $\alpha$ - $\beta$  tubulina em ovário na fase de pupa de *R. americana*. É possível observar a marcação da actina (em verde) delimitando as células do folículo ovariano e a marcação da  $\alpha$ - $\beta$  tubulina principalmente na região citoplasmática das células (Figura 38). Como controle negativo realizamos o ensaio de imunolocalização com a ausência do anticorpo primário de  $\alpha$ - $\beta$  tubulina (Figura 39). No entanto, outros experimentos precisam ser realizados para confirmar a localização celular da proteína Ra-Inx2 em tecidos de *R. americana*.



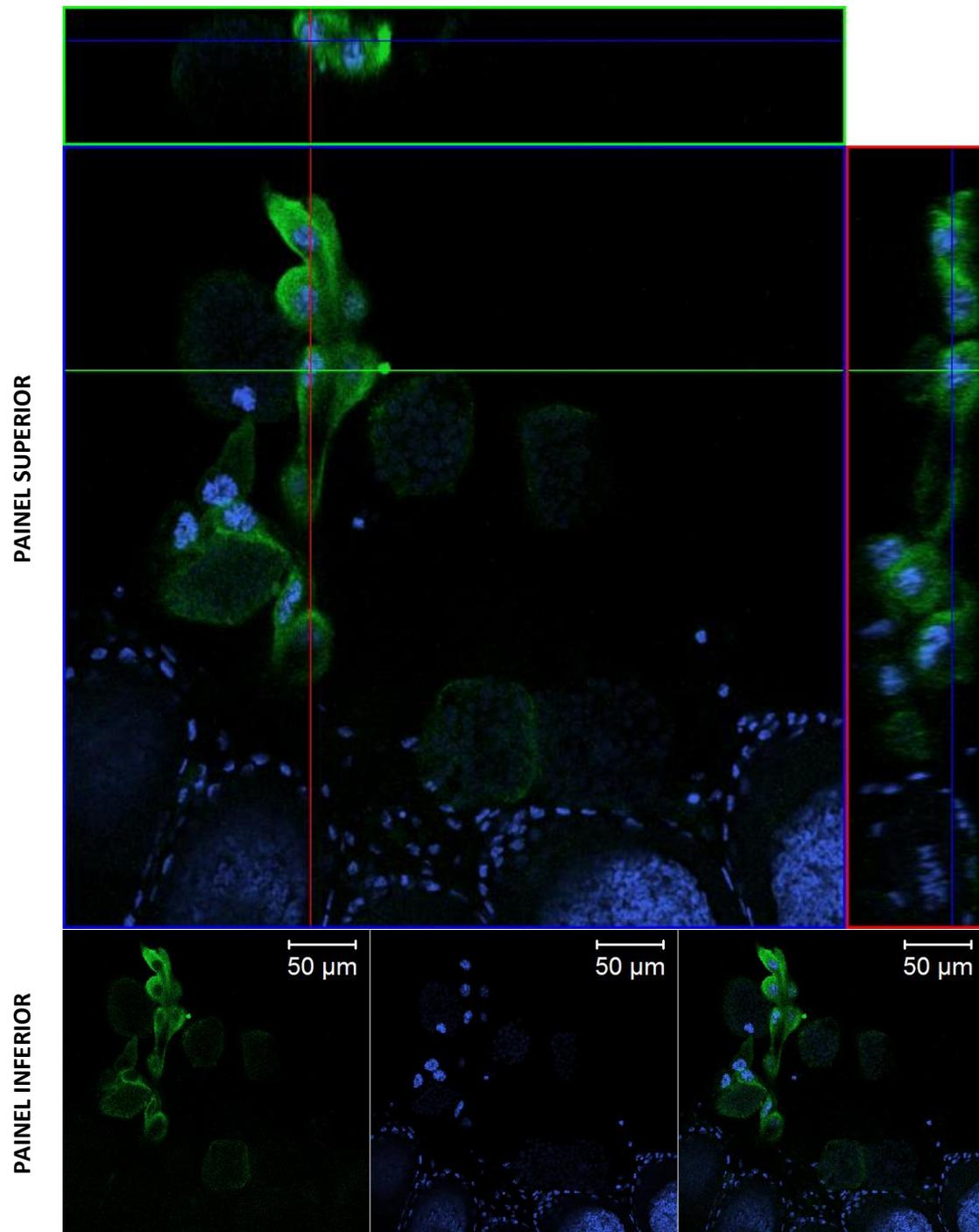
**Figura 32** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. No painel superior corte ortogonal: imunolocalização de Ra-inx2 em corpo gorduroso (terceiro período) de *R. americana*. DNA marcado com iodeto de propídio (em azul) e Ra-Inx2 marcado com FITC (em verde). No painel inferior os cortes em canais separados e a sobreposição da mesma marcação do painel superior.



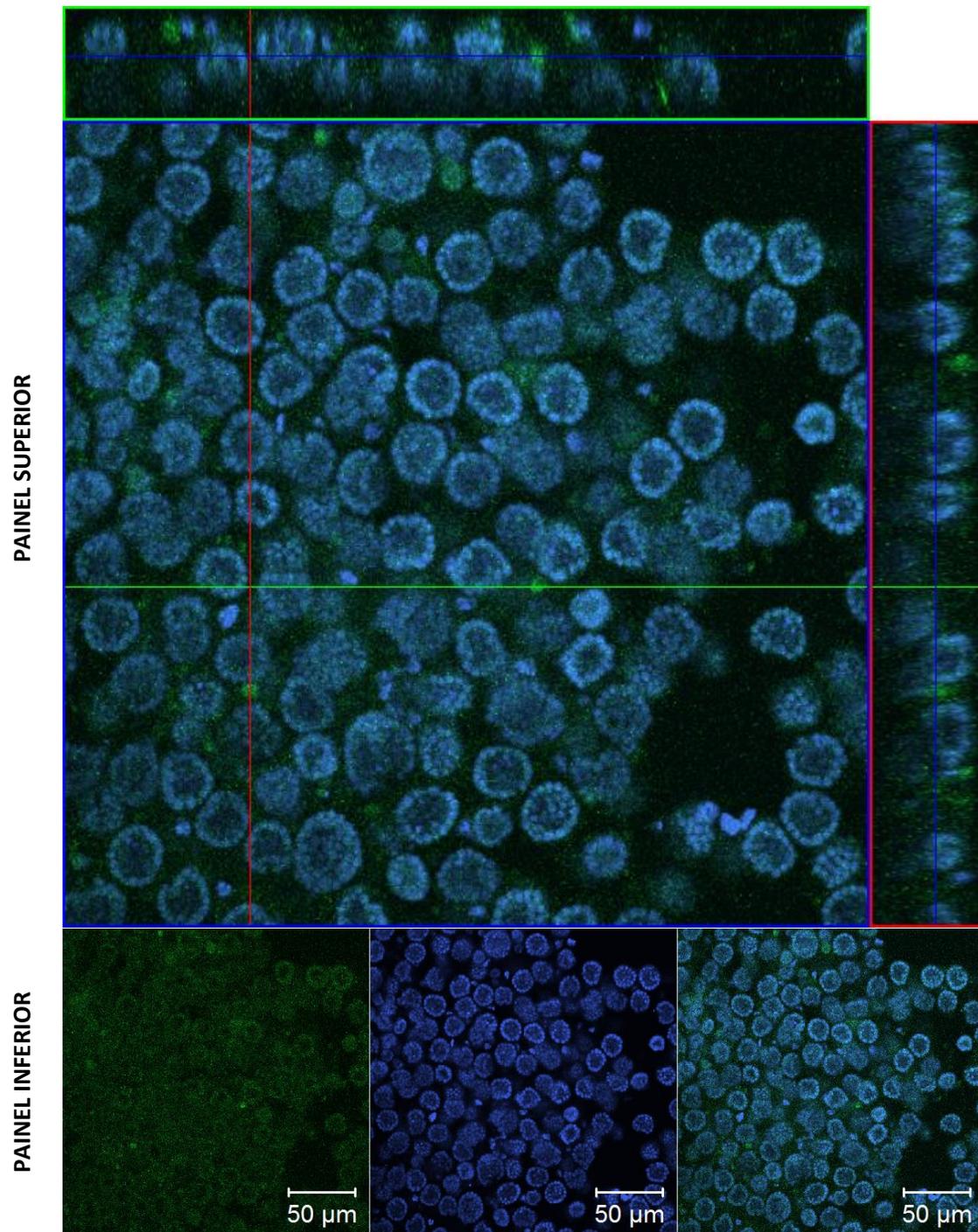
**Figura 33** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. No painel superior corte ortogonal: imunolocalização de Ra-inx2 em ovário (quinto período) de *R. americana*. DNA marcado com iodeto de propídio (em azul) e Ra-Inx2 marcado com FITC (em verde). No painel inferior os cortes em canais separados e a sobreposição da mesma marcação do painel superior.



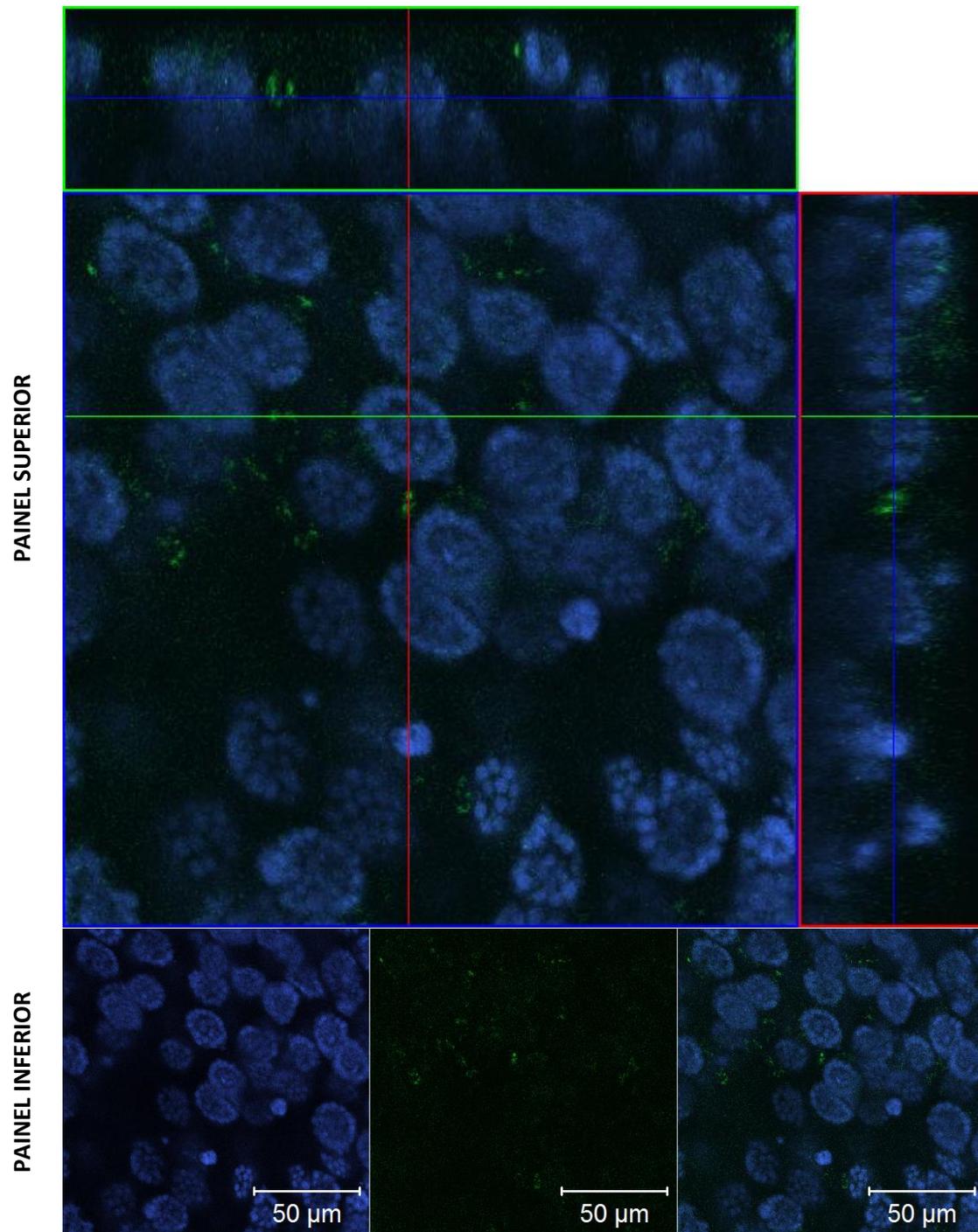
**Figura 34** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. No painel superior corte ortogonal: imunolocalização de Ra-inx2 em ovário (pupa) de *R. americana*. DNA marcado com iodeto de propídio (em azul) e Ra-Inx2 marcado com FITC (em verde). No painel inferior os cortes em canais separados e a sobreposição da mesma marcação do painel superior.



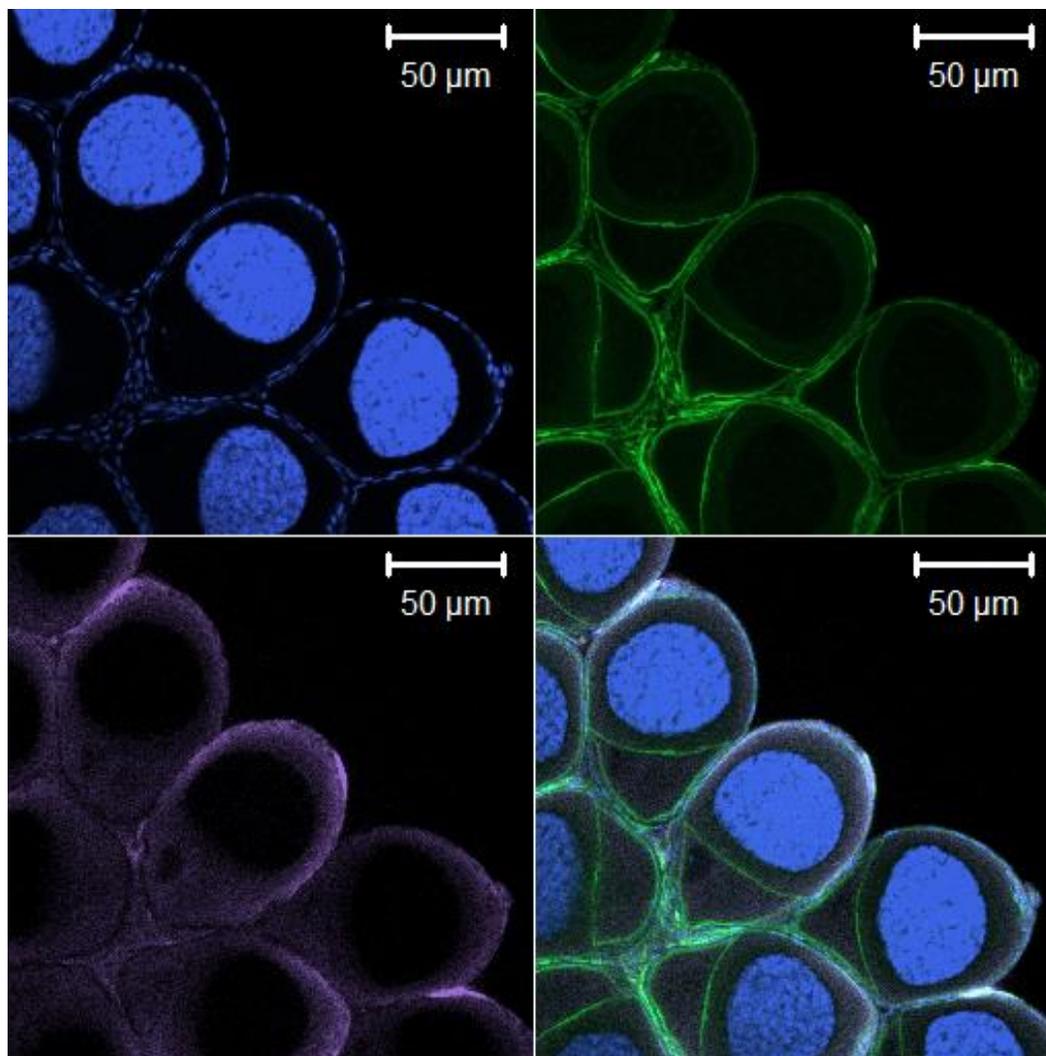
**Figura 35** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. No painel superior corte ortogonal: imunolocalização de Ra-inx2 em ovário (pupa) de *R. americana*. DNA marcado com iodeto de propídio (em azul) e Ra-Inx2 marcado com FITC (em verde). No painel inferior os cortes em canais separados e a sobreposição da mesma marcação do painel superior.



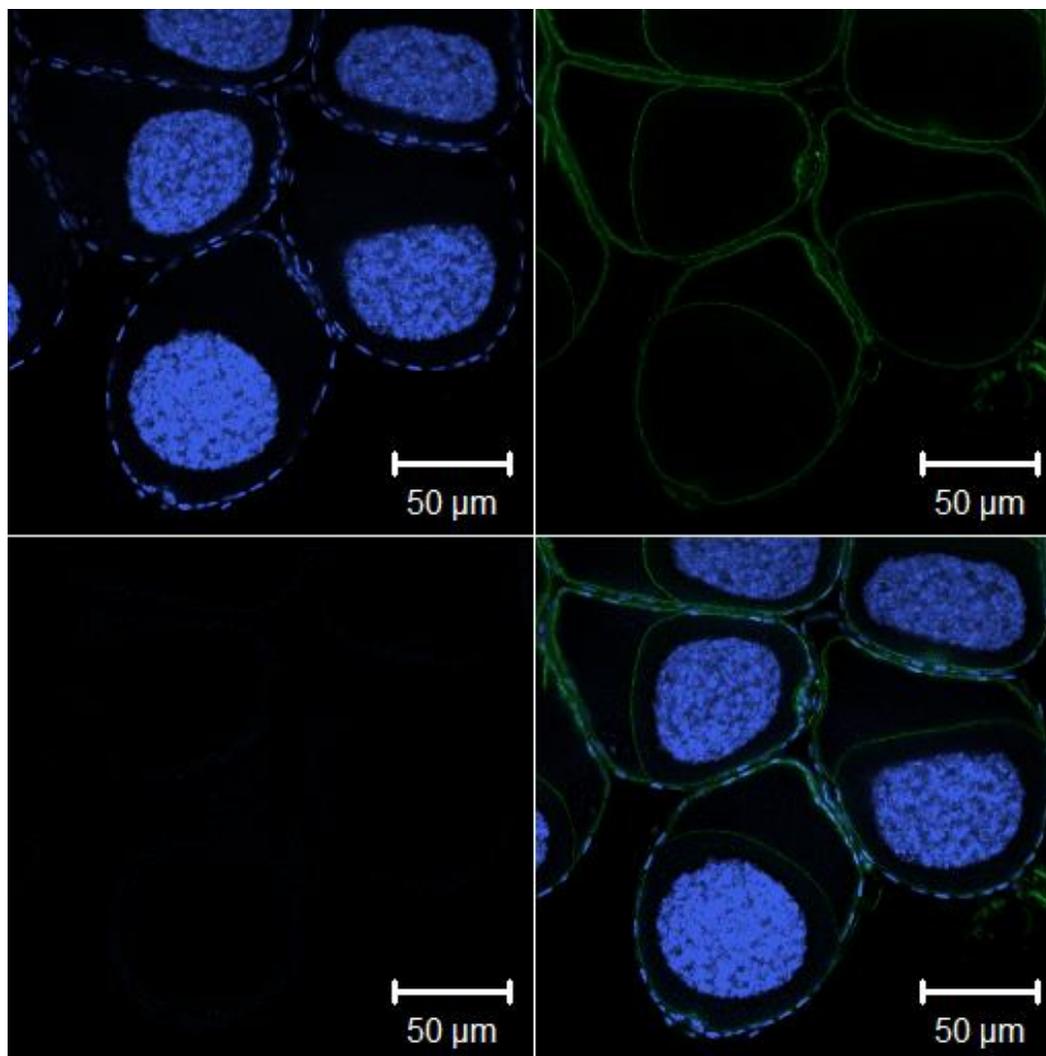
**Figura 36** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. No painel superior corte ortogonal: imunolocalização de Ra-inx2 em testículo (terceiro período) de *R. americana*. DNA marcado com iodeto de propídio (em azul) e Ra-Inx2 marcado com FITC (em verde). No painel inferior os cortes em canais separados e a sobreposição da mesma marcação do painel superior.



**Figura 37** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. No painel superior corte ortogonal: imunolocalização de Ra-inx2 em testículo (quinto período) de *R. americana*. DNA marcado com iodeto de propídio (em azul) e Ra-Inx2 marcado com FITC (em verde). No painel inferior os cortes em canais separados e a sobreposição da mesma marcação do painel superior.



**Figura 38** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Cortes em canais separados: imunolocalização do controle positivo em ovário (pupa) de *R. americana*. DNA marcado com iodeto de propídio (em azul), actina marcado com FITC (em verde) e  $\alpha$ -tubulina marcado com Cy-5 (em lilás). A última imagem do canto inferior direito a sobreposição dos três canais.

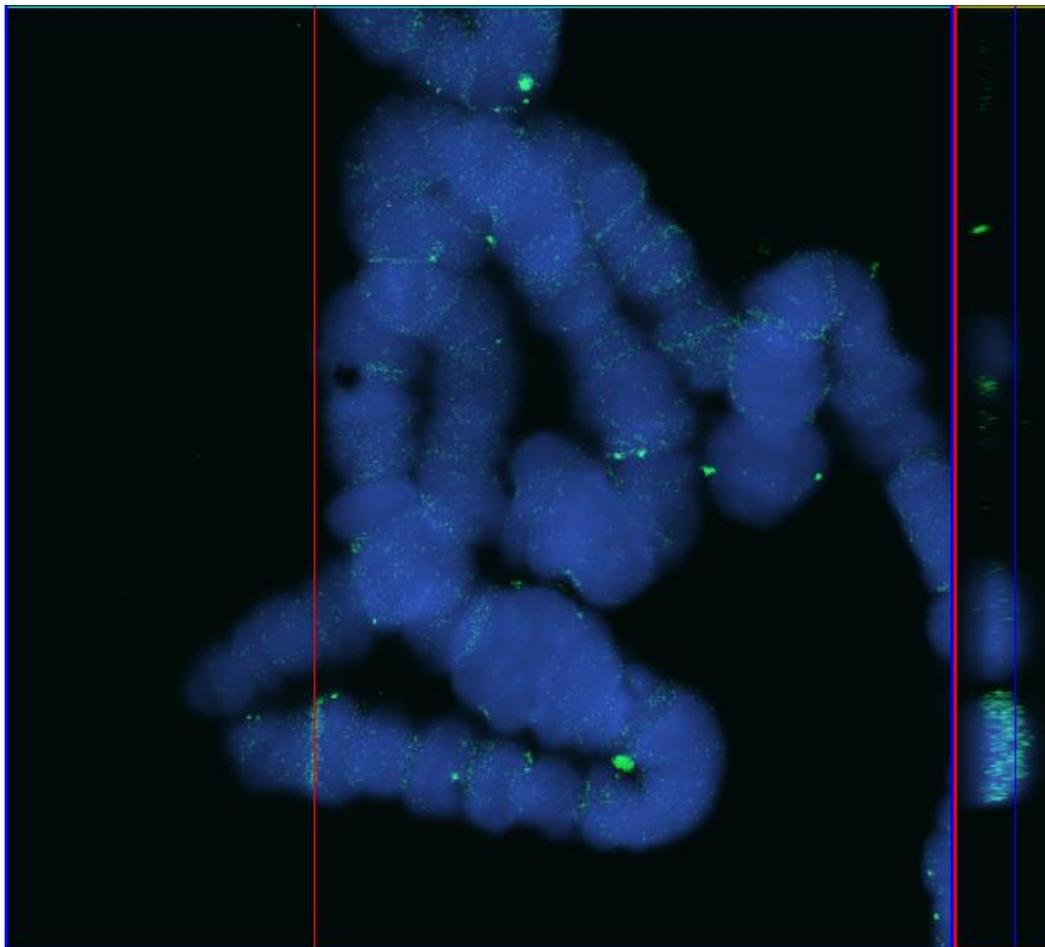


**Figura 39** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Cortes em canais separados: imunolocalização do controle negativo em ovário (pupa) de *R. americana*. DNA marcado com iodeto de propídio (em azul), actina marcado com FITC (em verde) e ausência do anticorpo primário anti- $\alpha$ - $\beta$  tubulina, sendo que o anticorpo secundário utilizado foi Cy-5. A última imagem do canto inferior direito a sobreposição dos três canais.

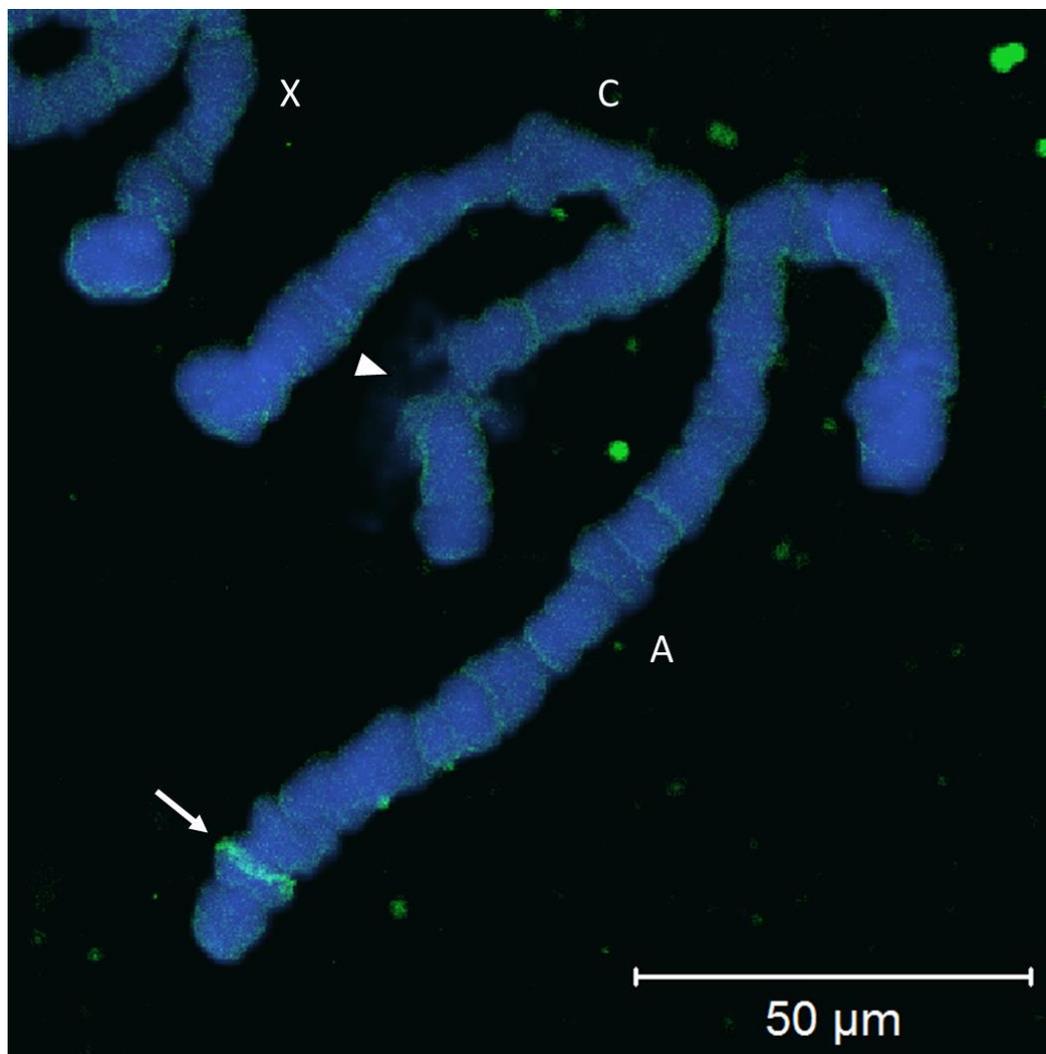
### 5.3.2 Localização cromossômica

A localização cromossômica de Ra-Inx2 foi feita por hibridização *in situ* utilizando cromossomos politênicos de glândula salivar de *R. americana*. A sonda foi sintetizada a partir da sequência genômica (ver na seção 4.14 do Material e Métodos). As imagens foram adquiridas por meio de microscopia confocal de varredura a laser.

Na Figura 40 mostramos o corte ortogonal da região com a marcação do gene Ra-Inx2 (em verde) através do cromossomo politênico (em azul) de *R. americana*. E na Figura 41 indicamos na seta a localização do gene Ra-Inx2 (em verde) na região 17 do cromossomo A (em azul) de glândulas salivar de *R. americana*. As glândulas foram coletadas no quinto período do desenvolvimento, que pode ser confirmado com a presença do pufe C3 (cabeça de seta). Na figura destacamos também os cromossomos politênicos A, C e X de *R. americana*.



**Figura 40** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Corte ortogonal: hibridização *in situ* do gene Ra-Inx2 (em verde) nos cromossomos politênicos (em azul) de glândula salivar de *R. americana*.



**Figura 41** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Hibridização in situ do gene Ra-Inx2 (em verde) nos cromossomos politênicos (em azul) de glândula salivar de *R. americana*. A marcação de Ra-Inx2 é identificada na seta. Os cromossomos A, C e X são identificados e na cabeça de seta mostrando pufe na região 3 do cromossomo C (pufe C3).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização molecular

Pela análise dos dados do sequenciamento do DNA genômico de Ra-Inx2 identificamos uma sequência de 2874 pares de base, sendo que dentro desta sequência confirmamos a presença de quatro regiões intrônicas que correspondem a 1797 pares de base, ou 62,5% da sequência (ver nas Figuras 8 e 9 *Figura 9*). Com o objetivo de identificar se ocorre splicing alternativo realizamos a amplificação por PCR das cinco regiões de exons e pela análise dos dados concluímos que nos tecidos estudados de *R. americana* não ocorre splicing alternativo (Figura 13). Stebbings et al. (2000) mostram que ocorre splicing em Dm-Inx2 em um único intron localizado fora da ORF, desta forma o splicing não causa alteração na sequência polipeptídica prevista. No entanto, Crompton et al. (1995) mostraram que em Dm-Inx8 o splicing afeta a ORF e conseqüentemente há alterações na sequência polipeptídica, sendo que estas variações ocorrem de forma diferente em cada tecido. Recentemente Calkins et al. (2015) mostraram que em *A. aegypt* ocorre splicing alternativo em Ae-Inx1 e Ae-Inx3 afetando a extremidade carboxi-terminal destas duas inxinas. Mostraram também que Ae-Inx2 tem dois exons codificando uma proteína de 359 e Ae-Inx7 quatro exons codificando uma proteína de 407 aminoácidos, sendo que nestas duas inxinas não identificaram splicing alternativo.

A partir do sequenciamento do mRNA de Ra-Inx2 nossos resultados mostram que a ORF tem 1077 nucleotídeos contando a partir do códon iniciador (**ATG**) até o códon de parada (**ATG**), sendo que a partir desta sequência conseguimos determinar a sequência consenso da proteína inxina-2 de *R. americana* (Figura 10). As análises que fizemos mostram que a sequência putativa da proteína tem 358 aminoácidos, este tamanho está de acordo com a sequência de inxinas caracterizadas em outros organismos. A identidade de Ra-Inx2 confirmamos com base nos resíduos de aminoácidos conservados, as duas cisteínas localizadas nas alças extracelulares e as sequências que correspondem aos quatro domínios transmembrana (Figura 16). Os resíduos de cisteínas localizados nas alças extracelulares são

essenciais para ancoragem do canal em células adjacente (Bao et al., 2004). Nos vertebrados cada alça extracelular tem três resíduos de cisteínas altamente conservados, sendo que nos invertebrados as inexas têm até dois resíduos de cisteínas, a exceção é a inexas-4 que possui o terceiro resíduo de cisteína nas alças **EL1** e **EL2** (Stebbing et al., 2002).

Outra característica que também encontramos é a sequência de cinco aminoácidos **YYQW** localizados especificamente no início do segundo domínio transmembrana (**TM2**), a função desta sequência ainda é desconhecida, no entanto é considerada uma assinatura entre as inexas (Barnes, 1994; Phelan, Starich, 2001). No segundo domínio transmembrana também encontramos o aminoácido prolina (**P**) que também faz parte da identidade das inexas. Curiosamente este aminoácido também é conservado no segundo domínio transmembrana das conexinas e está associado a ativação das mudanças conformacionais da proteína (Sanson, Weinstein, 2000; Suchnya et al., 1993).

O alinhamento mostrou que os domínios transmembrana tem um tamanho idêntico entre os diferentes organismos, sendo que **TM1**, **TM2**, **TM3** e **TM4** têm respectivamente 20, 22, 25 e 21 aminoácidos (Figura 17). As duas alças extracelulares **EL1** e **EL2** têm um tamanho de 52 e 66 aminoácidos respectivamente. De acordo com Bauer et al., (2005) em *D. melanogaster* as alças **EL1** e **EL2** de Dm-Inx2 têm um tamanho de 62 e 63 aminoácidos respectivamente. Os resultados que obtivemos das análises da sequência estão de acordo com os resultados adquiridos do programa Topcons (ver na Figura 19), sendo que no gráfico o valor de  $\Delta G$  representa a distância de cada resíduo de aminoácido em relação a membrana (Bernsel et al., 2009). Confirmando que as extremidades amino-terminal (**NT**) e carboxi-terminal (**CL**) estão voltadas para a região citoplasmática. Estudos têm associado que as regiões **NT** e **CL** têm função reguladora do canal e também atuam na formação de placas de junção comunicante (Martinez et al., 2003; Oshima et al., 2007). Com ajuda do programa RaptorX identificamos os domínios em alfa-hélice de Ra-Inx2 (Figura 21). Como encontrado em outras proteínas de junção, como as claudinas e ocludinas, os domínios em alfa-hélice das conexinas e inexas correspondem as regiões onde estão presente os domínios transmembrana (Hua et al., 2003). Os resultados mostram que a sequência consenso de Ra-Inx2 têm 34% de identidade e 55% de similaridade com a proteína Dm-Inx2 (ver na Tabela 4) e a predição da estrutura tridimensional da proteína mostra uma identidade de 77% em

relação a Dm-Inx2 e uma Tmscore de 0.670 confirmando que as duas proteínas têm dobras semelhantes (Figura 21).

Com base na sequência de aminoácidos, construímos uma árvore filogenética comparando com a sequência de inxina-2 de outros organismos disponíveis no GenBank (Figura 18). A árvore foi construída no programa MEGA 6 usando o método de máxima verossimilhança com um *bootstrap* de 1000 replicações, o qual calcula em porcentagem a confiabilidade da ocorrência para um determinado nó na árvore. Como esperado identificamos que Ra-Inx2 está agrupado com o grupo de inxinas de outros artrópodes, principalmente com os dípteros da família Culicidae, como *A. gambiae* e *A. sinensis*, comprovando os valores obtidos de identidade e similaridade. Os artrópodes representam o maior filo do reino Animal, representando aproximadamente 85% dos animais descritos. O subfilo Crustacea é representado na árvore por *Homarus 75signaling75* e *Cancer borealis* estão posicionados no mesmo grupo que os insetos, confirmando o nível de conservação entre os artrópodes. Estudos recentes têm confirmado que os insetos estão posicionados filogeneticamente no mesmo grupo dos crustáceos (Ducret et al., 2016; Shrut et al., 2014; Wang et al., 2015). No geral, os resultados que adquirimos estão de acordo com o mesmo padrão filogenético apresentado na literatura (Hasegawa, Turnbull, 2014; Phelan, 2005).

## 6.1 Perfil de expressão

Nossos resultados indicam que em glândula salivar ocorre maior expressão de Ra-Inx2 no sexto período do desenvolvimento de *R. americana* (Figura 22) e paralelamente neste período ocorre o processo apoptose nas células da glândula salivar, ocorrendo histólise deste tecido (Brandão et al., 2014). No entanto, a super-expressão de SI-Inx2 e SI-Inx3 em células de *Spodoptera litura* e a expressão ectópica em células de *Spodoptera frugiperda* promove apoptose das células (Liu et al., 2013). As conexinas também têm sido associadas com o processo de morte celular. Por exemplo, o silenciamento da conexina-32 retarda o processo de morte celular (Decrock et al., 2009).

No corpo gorduroso ocorre máxima expressão em pupa (Figura 24), e como observamos no sexto período de glândula salivar, também ocorre morte celular programada nesta fase. De acordo com Brandão et al. (2014) os níveis do hormônio 20-hidroxiecdisona tem um pico na fase de pupa e paralelamente as células do corpo gorduroso passam por um processo de remodelação. O processo de remodelação do corpo gorduroso de *R. americana* compreende na fragmentação do DNA característico de apoptose e ocorre processo de autofagia. De acordo com Wang et al. (2015) os hemicanais ativos podem estar envolvidos com as vias de sinalização de morte celular ou estar inibindo vias de sobrevivência da célula. Outra explicação, seria que a ativação do canal poderia aumentar a quantidade de  $Ca^{2+}$  intracelular aumentando a permeabilização da membrana externa das mitocôndrias (MOMP – Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). MOMP é um fator que induz a apoptose causando a liberação do citocromo C e a ativação da via das caspases (Wang et al., 2015).

A análise da expressão comparativa entre Ra-Inx2 e Ra-Inx7 em tecidos somáticos mostrou que em glândula salivar de *R. americana* a inxina Ra-Inx2 foi mais expressa no segundo período do desenvolvimento em relação a Ra-Inx7 (Figura 23). Em *A. aegypti* as inxinas Ae-Inx1, Ae-Inx2, Ae-Inx3 e Ae-Inx7 são fortemente expressas de em machos e fêmeas em todas as fases da vida (Calkins et al., 2015). No corpo gorduroso a expressão de Ra-Inx7 foi maior no quinto período em relação a Ra-Inx2 (Figura 25). Nos insetos o corpo gorduroso é um órgão importante participando da nutrição, principalmente da reserva dos nutrientes no período de não alimentação (Aguila et al., 2007). Em *A. aegypti* a inxina Ae-Inx7 foi mais expressa em órgãos do canal alimentar, como intestino e excretor como os túbulos de Malpighi (Calkins et al., 2015).

O fato da expressão ter aumentado no ovário ao longo do quarto estágio do desenvolvimento (Figura 26), pode estar associado com o fato do folículo ovariano aumentar consideravelmente de tamanho a partir do terceiro período, neste período a célula nutridora passa por ciclos endoreplicativos ocorrendo o processo de poliploidia (Machado-Santelli, Basile, 1975). No entanto, em pupa é onde ocorre os maiores níveis de expressão e paralelamente ocorre o processo de politenia e a célula nutridora tem seu potencial transcricional aumentado, nesta fase o ovócito encontra-se parado em meiose e os cromossomos têm sua transcrição pouco ativa. No entanto, a célula nutridora e as células

foliculares são responsáveis pela intensa síntese de mRNA. Stebbings et al., (2002) mostraram que no ovário de *D. melanogaster* a expressão de Dm-Inx1, Dm-Inx2, Dm-Inx3, Dm-Inx4 e Dm-Inx7. Outros estudos mostram que Dm-Inx2 estava co-localizada com Dm-Inx3 em células somáticas e co-localizada com Dm-Inx4 em células de linhagem germinativa (Lauteman, Bohrmann, 2016). O fato de Dm-Inx2 estar presente em células somáticas e germinativas é uma característica que também encontramos em Ra-Inx2.

No testículo de *R. americana* identificamos que Ra-Inx2 apresentou um padrão de expressão semelhante ao encontrado em ovário (Figura 28), sendo que este padrão também foi identificado por Hong et al. (2008) em *B. mori*. A expressão de Bm-Inx2, Bm-Inx3 e Bm-Inx4 em testículo foi muito parecida com a expressão encontrada em ovário durante a fase de larva, pré-pupa e pupa, sendo que Bm-Inx4 foi a inexistente mais expressa (Hong et al., 2008, 2009). Em *A. aegypti* a expressão de Ae-Inx2 foi considerada forte no testículo (Calkin et al., 2015).

Em tecidos constituídos predominantemente por células germinativas, nossos resultados mostram que Ra-Inx2 foi mais expressa do que Ra-Inx7 em ovário de *R. americana* (Figura 27). Stebbings et al. (2002) identificaram o mesmo padrão de expressão em *D. melanogaster*, sendo que Dm-Inx7 teve os menores níveis de expressão em relação as outras inexistentes. Calkins et al. (2015) mostraram a co-expressão das inexistentes Ae-Inx1, Ae-Inx2, Ae-Inx3 e Ae-Inx4 em ovários de *A. aegypti*, sendo que o mesmo padrão também foi descrito em ovários de *D. melanogaster* (Bohrmann, Zimmermann, 2008). No testículo a expressão de Ra-Inx2 foi maior no terceiro e no quinto período do desenvolvimento em relação a Ra-Inx7 (Figura 29). Em *A. aegypti* a expressão em testículo de Ae-Inx2 foi considerada forte, enquanto a expressão de Ae-Inx7 foi considerada fraca (Calkins et al., 2015).

Em embrião observamos que a expressão de Ra-Inx2 se manteve constante ao longo dos quatro primeiros dias de desenvolvimento (Figura 30), este perfil de expressão também foi observado por Hong et al. (2008) em *B. mori*, sendo que a expressão de Bm-Inx2 e Bm-Inx3 manteve o mesmo perfil de expressão ao longo do desenvolvimento embrionário, diferente de Bm-Inx4 que foi expressa apenas no primeiro dia do desenvolvimento (Hong et al., 2008, 2009). Em *D. melanogaster* as inexistentes Dm-Inx1, Dm-Inx2 e Dm-Inx3 participam

do desenvolvimento dorsal do embrião (Giuliani et al., 2013). Holcroft et al. (2013) demonstraram que a Dm-Inx1 e Dm-Inx2 participa do desenvolvimento do Sistema Nervoso Central em células gliais. Foi demonstrado também que Dm-Inx2 participa da organização do tecido epitelial durante a embriogênese (Bauer et al., 2004; Lehmann et al., 2006). Recentemente, Dm-Inx2 foi associada como reguladora do desenvolvimento dos olhos de *D. melanogaster* (Richard, Hoch et al., 2015).

A expressão comparativa em embrião de *R. americana* mostrou que Ra-Inx7 foi mais expresso no primeiro dia de desenvolvimento (Figura 31). Ostrowski et al. (2008) demonstraram que o *knock down* por RNAi de Dm-Inx7 resultam em severos distúrbios durante a embriogênese. Em *A. aegypti* a inexina Ae-Inx7 foi preferencialmente mais expressa em intestino, túbulos de Malpighi e na cabeça, o que indica que está inexina pode participar da digestão e também do desenvolvimento do sistema nervoso (Calkins et al., 2015). Em *D. melanogaster* foi identificado que Dm-Inx7 participa da formação do sistema nervoso e da memória (Ostrowski et al., 2008; Wu et al., 2011).

## 6.2 Localização celular

Os resultados que obtivemos de qPCR mostrou a expressão de mRNA de Ra-Inx2 em todos os tecidos estudados de *R. americana*. Para mostrar a presença da proteína Ra-Inx2 realizamos ensaios de imunolocalização em corpo gorduroso durante o terceiro período do quarto estágio larval do desenvolvimento e observamos que a localização da proteína Ra-Inx2 esteve circundando cada célula deste órgão (Figura 32). Em *D. melanogaster* a inexina Dm-Inx2 também foi localizada em tecidos de linhagem somática. Bauer et al. (2004) mostram que no embrião a Dm-Inx2 esteve localizada na região apico-lateral do intestino posterior e na região baso-lateral da glândula salivar.

Os resultados que obtivemos em ovário durante o quinto período do desenvolvimento mostra que Ra-Inx2 está localizada nas células entre os folículos de linhagem somáticas (Figura 33). Desta forma podemos indicar que Ra-Inx2 está preferencialmente localizada nas células de linhagem somáticas do ovário. No ovário de *D. melanogaster* a localização de Dm-

Inx2 também esteve preferencialmente localizada nas células de linhagem somática. De acordo com Bohrmann e Zimmermann (2008) a inxina Dm-Inx2 está localizada na região apico-lateral das células foliculares, sendo que pode interagir com Dm-Inx4 nas células de linhagem germinativas do oolema. Stebbings et al. (2000) mostram que Dm-Inx2 pode formar canais homotípicos ou pode se co-localizar com Dm-Inx3 formando canais heterotípicos. Outros estudos sugerem que Dm-Inx2 é dependente da expressão de Dm-Inx3. O *knockdown* de Dm-Inx3 por RNAi resulta no acúmulo citoplasmático de Dm-Inx2 (Lehmann et al., 2006). De acordo com Lehmann et al. (2006) por meio da técnica de ressonância plasmônica de superfície mostraram que Dm-Inx2 interage com Dm-Inx3 através da região carboxi-terminal formando canais heteroméricos.

Como observamos no quinto período da fase larval, no ovário na fase de pupa observamos a marcação de Ra-Inx2 nas células entre os folículos (Figura 34). No entanto, na fase de pupa também encontramos a marcação da proteína Ra-Inx2 nos hemócitos (Figura 35), que são células que se localizam na hemolinfa da cavidade abdominal com função imunológica, sendo que no momento da preparação aderem à superfície do ovário. Li et al. (2014) mostram que a expressão da inxina AGAP001476 aumenta em hemócitos de *A. gambiae* após a infecção por *Plasmodium*. Wang et al. (2015) identificaram em *S. paramamosain* a localização e a maior expressão Sp-Inx2 em hemócitos quando comparado com outras inxinas, sugerindo que esta inxina pode desempenhar função imunológica nos crustáceos.

No testículo realizamos ensaio de imunolocalização no terceiro período e no quinto período do quarto estágio larval de *R. americana* e pudemos observar que a localização de Ra-Inx2 está entre os espermatócitos, que são células de linhagem germinativa (ver nas Figuras 36 e 37). De acordo com Basile et al. (1974) em *R. americana* durante o processo de espermatogênese as células de linhagem germinativa apresentam um citoplasma rico em mitocôndrias, sendo rodeado por células nutridoras.

No entanto, de forma geral, nossos resultados de imunolocalização precisam ser confirmados com novos experimentos.

Por meio da técnica de hibridização *in situ* em cromossomos politênicos da glândula salivar de *R. americana* identificamos que o gene Ra-Inx2 está localizado na região 17 do cromossomo A (ver nas Figuras 40 e 41). Em *D. melanogater* o gene da Dm-Inx2 está localizado no cromossomo X na região 6E4 que incluem um cluster de genes de inexinas, como Dm-Inx1 e Dm-Inx7 (Stebbing et al., 2002).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos de caracterização molecular podemos inferir que a sequência com homologia a inexina-2 codifica uma proteína de junção comunicante. Desta forma podemos concluir que a sequência consenso da proteína Ra-Inx2 tem todas as características presentes em uma proteína da superfamília das inexinas, entre estas características encontramos principalmente os quatro domínios transmembrana, os dois pares de cisteínas localizados nas alças extracelular e a sequência **YYQW** presente especificamente no segundo domínio transmembrana e que é considerada uma assinatura entre as inexinas. Os resultados obtidos por meio de análise filogenética e construção da estrutura terciária de Ra-Inx2 confirmam os resultados.

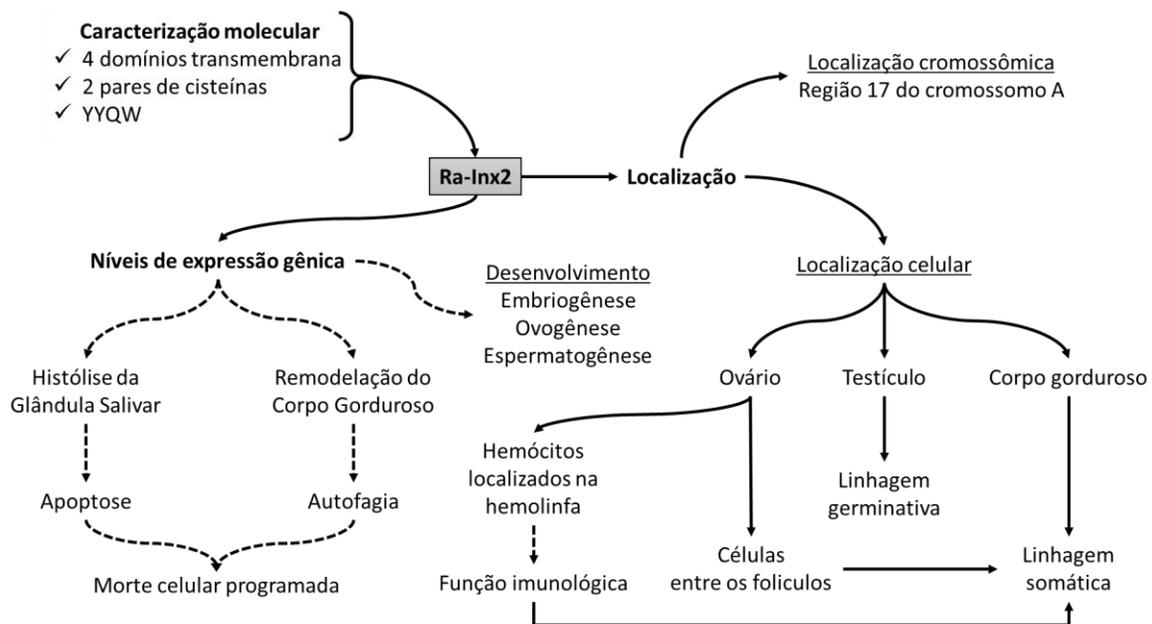
As análises dos níveis de expressão gênica de Ra-Inx2 sugerem que esta inexina pode estar envolvida durante a metamorfose em *R. americana*, possivelmente participando na remodelação do tecido gorduroso e na histólise da glândula salivar. Desta forma, em órgãos de linhagem somática a proteína Ra-Inx2 pode participar do processo de morte celular programada, sendo que no corpo gorduroso ocorre autofagia e nas células da glândula salivar ocorre apoptose.

Nas gônadas a expressão de Ra-Inx2 também foi significativa, sendo expressa ao longo do desenvolvimento do ovário e do testículo, indicando que esta inexina pode participar da ovogênese e espermatogênese. Durante a embriogênese também ocorreu a expressão de Ra-Inx2, sendo que durante o desenvolvimento embrionário a comunicação celular é fundamental. Desta forma podemos concluir que Ra-Inx2 foi expressa de forma consistente em todos os órgãos estudados ao longo do desenvolvimento de *R. americana*. A expressão comparativa com Ra-Inx7 indica que as inexinas estão presentes em todas as células e desta forma pode participar de diversos processos celulares e conseqüentemente da homeostase dos tecidos e desenvolvimento de *R. americana*.

Em corpo gorduroso mostramos que a proteína Ra-Inx2 está localizada entre as células deste tecido. Nos órgãos de linhagem germinativa Ra-Inx2 identificamos que no ovário esta proteína pode estar envolvida com a comunicação entre as células de linhagem

somática como as células entre os folículos e os hemócitos localizados ao redor do ovário, indicando que esta inxina pode participar da imunidade. No testículo observamos que Ra-Inx2 está localizado entre as células de linhagem germinativa e possivelmente pode participar da comunicação entre os espermatócitos durante o processo de espermatogênese. De forma geral os ensaios de imunolocalização precisam ser confirmados com novos experimentos.

Na Figura 42 mostramos um esquema resumindo os resultados que obtivemos e sugerindo o possível papel da proteína Ra-Inx2 durante o desenvolvimento e homeostase de *R. americana*. No entanto, a muito para ser estudado sobre o papel da proteína Ra-Inx2 e de outras inxinas nesta espécie, por se tratar de proteínas dinâmicas atuando em um organismo com características únicas este trabalho se torna desafiador e instigante.



**Figura 42** – Esquema mostrando o resumo dos resultados obtidos. Nas setas pontilhadas indicam os processos que Ra-Inx2 pode estar participando durante o desenvolvimento e homeostase de *R. americana*.

## REFERÊNCIAS\*

Abascal F, Zardoya R. Evolutionary analyses of gap junction protein families. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2013;1828(1):4-14.

AcaClone. pDRAW32. Version 1.1.131. 2016. [cited 2016 Out 25]. Available from: <http://www.acaclone.com/>.

Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG, Hoshizaki DK. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*. 2007;210(6):956-63.

Altun ZF, Chen B, Wang ZW, Hall DH. High resolution map of *Caenorhabditis elegans* gap junction proteins. *Developmental Dynamics*. 2009;238(8):1936-50.

Ambrosi C, Gassmann O, Pranskevich JN, Boassa D, Smock A, Wang J, et al. Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(32):24420-31.

Anava S, Rand D, Zilberstein Y, Ayali A. Innexin genes and gap junction proteins in the locust frontal ganglion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;39(3):224-33.

Ayukawa T, Matsumoto K, Ishikawa HO, Ishio A, Yamakawa T, Aoyama N, et al. Rescue of Notch signaling in cells incapable of GDP-L-fucose synthesis by gap junction transfer of GDP-L-fucose in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(38):15318-23.

Bao X, Chen Y, Reuss L, Altenberg GA. Functional expression in *Xenopus* oocytes of gap-junctional hemichannels formed by a cysteine-less connexin 43. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(11):9689-92.

Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology*. 2006;21(2):103-14.

Barnes TM. OPUS: a growing family of gap junction proteins?. *Trends in Genetics*. 1994;10(9):303-305.

Basile R, Casartelli C, Benozzati ML. Desenvolvimento dos Testículos e Ovários de “*Rhynchosciara*”. *Ciência e Cultura*. 1975;27(2):151-158.

Basile R. Aspects of ovary development in *Rhynchosciara*. *Revista Brasileira de Genética*. 1979;145-60.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Bauer R, Lehmann C, Martini J, Eckardt F, Hoch M. Gap junction channel protein innexin 2 is essential for epithelial morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Molecular Biology of The Cell*. 2004;15(6):2992-04.

Bauer R, Löer B, Ostrowski K, Martini J, Weimbs A, Lechner H, et al. Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chemistry & Biology*. 2005;12(5):515-526.

Bernsel A, Viklund H, Hennerdal A, Elofsson A. TOPCONS. 2015. [cited 2016 Out 10]. Available from: <http://topcons.cbr.su.se/>.

Bernsel A, Viklund H, Hennerdal A, Elofsson A. TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Research*. 2009;37:465-68.

Blagburn JM, Alexopoulos H, Davies JÁ, Bacon JP. Null Mutation in shaking-B Eliminates Electrical, but not Chemical, Synapses in the *Drosophila* Giant Fiber System: A Structural Study. *Journal of Comparative Neurology*. 1999;404(4):449-58.

Bohrmann J, Zimmermann J. Gap junctions in the ovary of *Drosophila melanogaster*: localization of innexins 1, 2, 3 and 4 and evidence for intercellular communication via innexin-2 containing channels. *BMC Developmental Biology*. 2008; 8(1):1.

Brandão AS, do Amaral JB, Rezende-Teixeira P, Hartfelder K, Siviero F, Machado-Santelli GM. Cell death and tissue reorganization in *Rhynchosciara americana* (Sciaridae: Diptera) metamorphosis and their relation to molting hormone titers. *Arthropod structure & Development*. 2014;43(5):511-22.

Breuer ME, Pavan C. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma*. 1955;7(1):371-86.

Breuer, ME. Revision of the genus *Rhynchosciara* Rübsaamen (Diptera, Sciaridae) in the neotropical region. *Arquivos de Zoologia*. 1969;17(4):167-198.

Calkins TL, Woods-Acevedo MA, Hildebrandt O, Piermarini PM. The molecular and immunochemical expression of innexins in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: Insights into putative life stage- and tissue-specific functions of gap junctions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2015;183:11-21.

Cao F, Eckert R, Elfgang C, Nitsche JM, Snyder JÁ, Hülser DF, et al. A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *Journal of Cell Science*. 1998; 111(1):31-43.

Cottrell GT, Burt JM. Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1711(2):126-41.

Crompton D, Todman M, Wilkin M, Ji S, Davies J. Essential and neural transcripts from the *Drosophila* shaking-B locus are differentially expressed in the embryonic mesoderm and pupal nervous system. *Developmental Biology*. 1995;170(1):142-58.

Curtin KD, Zhang Z, Wyman RJ. Gap junction proteins expressed during development are required for adult neural function in the *Drosophila* optic lamina. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(16):7088-96.

Dahl G, Locovei S. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question?. *IUBMB Life*. 2006;58(7):409-19.

Decrock E, Vinken M, De Vuyst E, Krysko DV, D'Herde K, Vanhaecke T, et al. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die&quest. *Cell Death & Differentiation*. 2009;16(4):524-36.

Ducret E, Alexopoulos H, Le Feuvre Y, Davies JÁ, Meyrand P, Bacon JP, et al. Innexins in the lobster stomatogastric nervous system: cloning, phylogenetic analysis, developmental changes and expression within adult identified dye and electrically coupled neurons. *European Journal of Neuroscience*. 2006;24(11):3119-33.

Eastman SD, Chen THP, Falk MM, Mendelson TC, Iovine MK. Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. *Genomics*. 2006;87(2):265-74.

Giuliani F, Giuliani G, Bauer R, Rabouille C. Innexin 3, a new gene required for dorsal closure in *Drosophila* embryo. *PloS One*. 2013;8(7):e69212.

Goodenough DA, Paul DL. Gap junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009;1(1):a002576.

Hall T. BioEdit (Biological Sequence Alignment). Version 7.2.5. 2013. [cited 2016 Oct 20]: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.

Hasegawa DK, Turnbull MW. Recent findings in evolution and function of insect innexins. *FEBS Letters*. 2014;588(8):1403-10.

Hervé JC, Phelan P, Bruzzone R, White TW. Connexins, innexins and pannexins: bridging the communication gap. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2005;1719(1):3-5.

Holcroft CE, Jackson WD, Lin WH, Bassiri K, Baines RA, et al. Innexins Ogr and Inx2 are required in glial cells for normal postembryonic development of the *Drosophila* Central Nervous System. *Journal of Cell Science*. 2013;126(17):3823-34.

Hong SM, Kang SW, Goo TW, Kim NS, Lee JS, Kim KA, et al. Two gap junction channel (innexin) genes of the *Bombyx mori* and their expression. *Journal of Insect Physiology*. 2008;54(1):180-91.

Hong SM, Noh SK, Kim KA, Mitsunobu H, Mon H, Lee JM, et al. Molecular characterization, localization, and distribution of innexins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biotechnology*. 2009;43(1):52-58.

Horne-Badovinac S, Bilder D. Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Developmental Dynamics*. 2005;232(3):559-74.

Hua VB, Chang AB, Tchieu JH, Kumar NM, Nielsen PA, Saier Jr MH. Sequence and phylogenetic analyses of 4 TMS junctional proteins of animals: connexins, innexins, claudins and occludins. *The Journal of Membrane Biology*. 2003;194(1):59-76.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in The Biosciences*. 1992;8:275-82.

Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*. 2012;7:1511–22.

Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J. RaptorX. 2012. [cited 2016 Out 15]. Available from: <http://raptorx.uchicago.edu/>.

Kandarian B, Sethi J, Wu A, Baker M, Yazdani N, Kym E, et al. The medicinal leech genome encodes 21 innexin genes: different combinations are expressed by identified central neurons. *Development Genes and Evolution*. 2012;222(1):29-44.

Lara FJS, Tamaki H, Pavan C. Laboratory culture of *Rhynchosciara angelae*. *The American Naturalist*, 1965;99(906):189-91.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947-48.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. ClustalX and ClustalW. Version 2.0. 2007. [cited 2016 Out 20]. Available from: <http://www.clustal.org/clustal2/>.

Lautemann J, Bohrmann J. Relating proton pumps with gap junctions: colocalization of ductin, the channel-forming subunit c of V-ATPase, with subunit a and with innexins 2 and 3 during *Drosophila* oogenesis. *BMC Developmental Biology*. 2016;16(1):24.

Lechner H, Josten F, Fuss B, Bauer R, Hoch M. Cross regulation of intercellular gap junction communication and paracrine signaling pathways during organogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 2007;310(1):23-34.

Lehmann C, Lechner H, Lör B, Knieps M, Herrmann S, Famulok M, et al. Heteromerization of innexin gap junction proteins regulates epithelial tissue organization in *Drosophila*. *Molecular Biology of The Cell*. 2006;17(4):1676-85.

Leitch B. Ultrastructure of electrical synapses: review. *Electron Microscopy Reviews*. 1992;5(2):311-39.

Li MW, Wang J, Zhao YO, Fikrig E. Innexin AGAP001476 is critical for mediating anti-Plasmodium responses in Anopheles mosquitoes. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(36):24885-97.

Liu T, Li M, Zhang Y, Pang Z, Xiao W, Yang Y, et al. A role for Innexin2 and Innexin3 proteins from *Spodoptera litura* in apoptosis. *PloS One*. 2013;8(7):e70456.

Machado-Santelli GM, Basile R. DNA replication and DNA puffs in salivary chromosomes of *Rhynchosciara*. *Ciencia e Cultura*. 1975;27(2):167:74.

Machado-Santelli GM, Ionta M. Gap Junction Intercellular Communication and Connexin Expression Profile in Normal Liver Cells and Hepatocarcinoma. 2012;13:275-286.

Martínez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. A carboxyl terminal domain of connexin43 is critical for gap junction plaque formation but not for homo-or hetero-oligomerization. *Cell Communication & Adhesion*. 2003;10(4-6):323-28.

NCBI. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). 2016. [cited 2016 Out 5]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

NCBI. ORFfinder (Open Reading Frame Finder). 2016. [cited 2016 Out 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>.

Nonato E, Pavan C. A new species of *Rhynchosciara* Rubsaamen, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 1951;11:435-437.

Ohta Y, Nishikawa K, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y. Electron tomographic analysis of gap junctions in lateral giant fibers of crayfish. *Journal of Structural Biology*. 2011;175(1):49-61.

Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. 2014. Protter. [cited 2016 Out 15]. Available from: <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>.

Oshima A, Matsuzawa T, Murata K, Tani K, Fujiyoshi Y. Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel. *Journal of Molecular Biology*. 2016;428(6):1227-36.

Oshima A, Matsuzawa T, Nishikawa K, Fujiyoshi Y. Oligomeric structure and functional characterization of *Caenorhabditis elegans* Innexin-6 gap junction protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(15):10513-21.

Oshima A, Tani K, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Sosinsky GE. Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(24):10034-39.

Ostrowski K, Bauer R, Hoch M. The *Drosophila* innexin7 gap junction protein is required for development of the embryonic nervous system. *Cell Communication & Adhesion*. 2008; 15(1-2):55-67.

Panchina Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current Biology*. 2000;10(13):473-74.

Pavan C, Breuer ME. Polytene chromosomes in different tissues of *Rhynchosciara*. *Journal of Heredity*. 1952;43(4):151-58.

Pavan C, Cunha ABD. Chromosomal activities in *Rhynchosciara* and other Sciaridae. *Annual Review of Genetics*. 1969;3(1):425-50.

Pavan C. Nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and problem of differentiation. In *Brookhaven Symposia in Biology*. 1965;18:222.

Pézier AP, Jezzini SH, Bacon JP, Blagburn JM, Shaking B mediates synaptic coupling between auditory sensory neurons and the giant fiber of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2016;11(4):0152211.

Phelan P, Bacon JP, Davies JA, Stebbings LA, Todman MG, Avery L, et al. Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends in Genetics*. 1998;14(9):48.

Phelan P, Starich TA. Innexins get into the gap. *Bioessays*. 2001;23(5):388-96.

Phelan P. Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1711(2):225-45.

Razzell W, Evans IR, Martin P, Wood W. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Current Biology*. 2013;23(5):424-29.

Rezende-Teixeira P, Siviero F, Brandão AS, Santelli RV, Machado-Santelli GM. Molecular characterization of a retrotransposon in the *Rhynchosciara americana* genome and its association with telomere. *Chromosome Research*. 2008;16(5):729-42.

Richard M, Hoch M. *Drosophila* eye size is determined by Innexin 2-dependent Decapentaplegic 88signaling. *Developmental Biology*. 2015;408(1):26-40.

Sansom MS, Weinstein H. Hinges, swivels and switches: the role of prolines in 88signaling via transmembrane  $\alpha$ -helices. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000;21(11):445-51.

Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biology*. 2007;3(03):199-08.

Shruti S, Schulz DJ, Lett KM, Marder E. Electrical coupling and innexin expression in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *Journal of Neurophysiology*. 2014;112(11):2946-58.

Siviero F, Rezende-Teixeira P, Andrade A, Machado-Santelli GM, Santelli RV. Analysis of expressed sequence tags from *Rhynchosciara americana* salivary glands. *Insect Molecular Biology*. 2006;15(2):109-18.

Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*. 2004;62(2):228-32.

Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels*. 2011;5(3):193-97.

Stebbing LA, Todman MG, Phelan P, Bacon JP, Davies JA. Two *Drosophila* innexins are expressed in overlapping domains and cooperate to form gap-junction channels. *Molecular Biology of The Cell*. 2000;11(7):2459-70.

Stebbing LA, Todman MG, Phillips R, Greer CE, Tam J, Phelan P, et al. Gap junctions in *Drosophila*: developmental expression of the entire innexin gene family. *Mechanisms of Development*. 2002;113(2):197-05.

Suchyna TM, Xu LX, Gao F, Fournier CR, Nicholson BJ. Identification of a proline residue as a transduction element involved in voltage gating of gap junctions. *Nature*. 1993;365:847-49.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Version 6.0. 2007. [cited 2016 Oct 15]. Available from: <http://www.megasoftware.net/>.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30:2725-29.

Thailayil J, Magnusson K, Godfray HCJ, Crisanti A, Catteruccia F. Spermless males elicit large-scale female responses to mating in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(33):13677-81.

Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science*. 1999;283(5405):1176-80.

Van Der Zee M, Benton MA, Vazquez-Faci T, Lamers GE, Jacobs CG, Rabouille C. Innexin7a forms junctions that stabilize the basal membrane during cellularization of the blastoderm in *Tribolium castaneum*. *Development*. 2015;142(12):2173-83.

Wang SP, Chen FY, Dong LX, Zhang YQ, Chen HY, Qiao K, Wang KJ. A novel innexin2 forming membrane hemichannel exhibits immune responses and cell apoptosis in *Scylla paramamosain*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2015;47(1):485-99.

Watanabe T, Kankel DR. The *l (1) oge* gene of *Drosophila melanogaster* is expressed in postembryonic neuroblasts. *Developmental Biology*. 1992;152(1):172-83.

Weng XH, Piermarini PM, Yamahiro A, Yu MJ, Aneshansley DJ, Beyenbach KW. Gap junctions in Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*. 2008;211(3):409-22.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M. et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological Chemistry*. 2002;383(5):725-37.

Winter CE, De Bianchi AG, Terra WR, Lara FJS. The giant DNA puffs of *Rhynchosciara americana* code for polypeptides of the salivary gland secretion. *Journal of Insect Physiology*. 1977;23(11):1455-59.

Wu CL, Shih MFM, Lai JSY, Yang HT, Turner GC, Chen L, et al. Heterotypic gap junctions between two neurons in the drosophila brain are critical for memory. *Current Biology*. 2011;21(10):848-54.

Zhang Z, Curtin KD, Sun YA, Wyman RJ. Nested transcripts of gap junction gene have distinct expression patterns. *Journal of Neurobiology*. 1999;40(3):288-01.