



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO MULTIDISCIPLINAR UFRJ – MACAÉ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



IAN DE OLIVEIRA GOMES

**O PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ZELDA NA REGENERAÇÃO DE  
MEMBROS NAS LARVAS DO BESOURO *Tribolium castaneum***

MACAÉ – RJ

2022

IAN DE OLIVEIRA GOMES

**O PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ZELDA NA REGENERAÇÃO DE  
MEMBROS NAS LARVAS DO BESOIRO *Tribolium castaneum***

Trabalho de conclusão de curso (TCC)  
apresentado ao Curso de Farmácia do Centro  
Multidisciplinar UFRJ – Macaé, como requisito  
para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca  
Coorientador: Prof. Dr. Cíntia Monteiro de Barros

MACAÉ – RJ

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

G633

Gomes, Ian de Oliveira

O papel do fator de transcrição Zelda na regeneração de membros nas larvas de besouro *Tribolium castaneum* / Ian de Oliveira Gomes - Macaé, 2022.

54 f.

Orientador(a): Rodrigo Nunes da Fonseca.

Coorientador(a): Cíntia Monteiro de Barros .

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. *Tribolium castaneum*. 2. Gene Zelda. 3. Regeneração (Biologia).  
4. Hemócitos. I. Fonseca, Rodrigo Nunes da, orient. II. Barros, Cíntia Monteiro de.,  
coorient. III. Título.

CDD 571

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a)  
Biblioteca Central do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé  
Bibliotecário: Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

IAN DE OLIVEIRA GOMES

O PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ZELDA NA REGENERAÇÃO DE  
MEMBROS NAS LARVAS DO BESOURO *Tribolium castaneum*

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para  
obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 10 de junho de 2022

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca (Presidente da banca)

Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade - NUPEM

<http://lattes.cnpq.br/5456237658132719>

Prof. Dra. Samantha

Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé

<http://lattes.cnpq.br/7971993553708579>

Prof. Dr José Nepomuceno

Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM

<http://lattes.cnpq.br/5911558459115933>

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares, em especial meus pais, Luciana e Elielmo, por me darem apoio durante meu período na universidade e me possibilitarem buscar o ensino superior, a minha tia Consuelo e seu esposo Poty, que durante os 5 anos de faculdade me acolheram em sua casa de portas abertas.

Aos meus amigos, que ao longo da graduação me proporcionaram memórias inesquecíveis e tornaram a graduação uma experiência um pouco mais leve e prazerosa, em especial a minha namorada Raquel, por todo o apoio, amor e aprendizado de vida que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como formando.

Ao meu orientador Rodrigo Nunes, por realizar meu primeiro contato com a pesquisa, por toda atenção, orientação e oportunidades que me foram fornecidos.

A todos os meus colegas de laboratório do LICM (Laboratório Integrado de Ciências Morfológicas), por toda a ajuda e aprendizado experimental que obtive durante o meu tempo no laboratório, um agradecimento em especial ao pós-doutor Lupis Ribeiro, que me ajudou muito na construção geral deste trabalho.

*“O ser humano não pode deixar de cometer erros; é com os erros, que os homens de bom senso aprendem a sabedoria para o futuro.”*

*(Plutarco)*

## RESUMO

**Introdução:** Os insetos representam cerca de 60% do número de espécies descritas, tornando-se assim de longe o grupo de animais mais diversos do planeta. As larvas do besouro *Tribolium castaneum* são capazes de regenerar seus apêndices após uma ou duas mudas. Os mecanismos envolvidos nos processos de regeneração ainda não são completamente compreendidos, particularmente, o controle molecular e celular da proliferação e da diferenciação durante este processo. Em algumas espécies-modelo foi descrito um papel importante das células sanguíneas na regeneração, a partir de migração e diferenciação no local da lesão, todavia não se sabe se este papel é conservado em outras espécies. O fator de transcrição pioneiro *zelda* (*zld*) é capaz de se ligar em nucleossomas e reprogramar células de seu estágio diferenciado para seu estágio indiferenciado, sendo essencial para células progenitoras durante o desenvolvimento embrionário. Se hemócitos estão envolvidos na regeneração de membros pós-lesão no besouro *T. castaneum* e se *zld* é importante para este processo, não é conhecido. As informações e aprendizados conquistados nos estudos genéticos e moleculares do processo de regeneração em espécies-modelo são valiosos para que possamos obter uma melhor compreensão deste em organismos mais complexos, como nós humanos. **Objetivos:** 1) Investigar se o gene *zelda* está envolvido na regeneração dos apêndices; 2) Caracterizar morfológicamente os hemócitos circulantes em larvas do besouro *T. castaneum*; 3) Caracterizar se o gene *zelda* é expresso nos hemócitos deste besouro; **Materiais e métodos:** Os besouros foram mantidos em uma estufa à 30°C e umidade relativa de aproximadamente 45%. Larvas no estágio 6-7 foram selecionadas e submetidas à extração da hemolinfa para análise da expressão do fator de transcrição (FT) *zld*. A hemolinfa extraída foi fixada e corada para observação utilizando microscópio ótico e contrastada para observação em microscópio eletrônico. Larvas no quarto e quinto estágio foram submetidas à lesão e injetadas com RNA de interferência (RNAi - silenciamento gênico) para *zld* e observação da progressão dos processos regenerativos. **Resultados e Discussão:** As larvas que sofreram o silenciamento do FT *zld* por RNAi não regeneraram os apêndices quando comparadas com o grupo controle. Nove tipos celulares distintos foram identificados pela observação e análise comparativa morfológica das células circulantes da hemolinfa. Não foi observada expressão de *zld* na hemolinfa, embora a expressão do gene constitutivo *rps3* tenha sido identificada. **Conclusão:** O *T. castaneum* pode caracterizar um modelo interessante para estudo do processo de regeneração. A expressão do FT *zld* é essencial para a regeneração dos membros, uma vez que a diminuição da expressão de *zld* leva a uma falha de sua regeneração. O mecanismo pelo qual o *zld* está envolvido no processo de regeneração provavelmente não envolve sua expressão e participação via hemócitos, sendo necessário mais estudos para elucidá-lo.

Palavras-chave: *Tribolium castaneum*, modelo de regeneração, *zelda*, regeneração, hemócitos

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Regeneração e cicatrização.....	10
<b>Figura 2</b> - Rotas para regeneração celular .....	12
<b>Figura 3</b> - Discos imaginais <i>D. melanogaster</i> .....	14
<b>Figura 4</b> - Formação das pernas do <i>Gryllus bimaculatus</i> . .....	15
<b>Figura 5</b> - <i>T.castaneum</i> , estruturas dos membros das larvas e adultos .....	16
<b>Figura 6</b> - Estrutura dos fatores de transcrição pioneiros .....	18
<b>Figura 7</b> - Resumo do primeiro experimento de regeneração .....	28
<b>Figura 8</b> - Larvas 3 dias após a injeção.....	30
<b>Figura 9</b> - Larvas 6 dias após injeção.....	31
<b>Figura 10</b> - Larvas 10 dias após injeção, fixadas em PFA.....	33
<b>Figura 11</b> - Pupas 14 dias após a injeção .....	34
<b>Figura 12</b> - Besouros 22 dias após injeção, fixados em PFA. ....	35
<b>Figura 13</b> - Confirmação dos fenótipos esperados do silenciamento <i>zld</i> .....	36
<b>Figura 14</b> - Hemócitos <i>T.castaneum</i> .....	39
<b>Figura 15</b> - Gel de agarose do PCR <i>zld</i> hemócitos/embrião .....	41
<b>Figura 16</b> - Gel de agarose a partir de RT-PCR: Larvas não lesionadas e sua hemolinfa.....	42
<b>Figura 17</b> - Gel de agarose a partir de RT-PCR: Larvas após lesão e sua hemolinfa .....	42
<b>Figura 18</b> - Fluxograma dos possíveis mecanismos de ação do <i>zld</i> na regeneração .....	43



## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Besouros <i>dsz/d</i> ao fim da metamorfose.....	29
<b>Gráfico 2</b> - Sobrevivência dos indivíduos ao longo da metamorfose.....	30

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>T. castaneum</i>	<i>Tribolium castaneum</i>
FT	Fator de Transcrição
ZLD	Zelda
HCTs	Hemócitos
PFA	Paraformaldeído
PBS	Salina tamponada com fosfato
dsRNA	RNA dupla fita
cDNA	DNA complementar
DM	Diâmetro Médio
dsZLD	dupla fita de RNA Zelda
RNAi	RNA de interferência
PCR	Reação em cadeia da polimerase

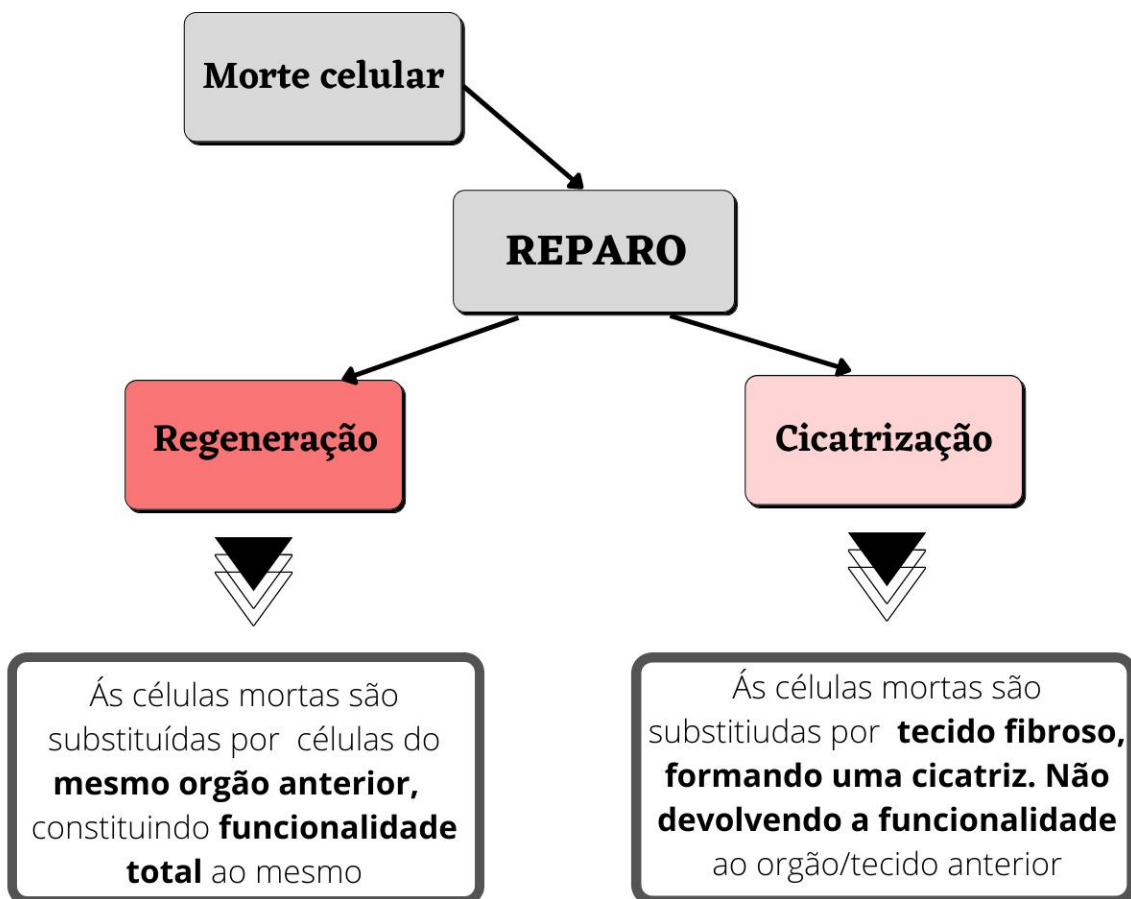
## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
1.1	REGENERAÇÃO NOS INSETOS	12
1.2	FORMAÇÃO DAS PERNAS NOS INSETOS	13
1.3	FATOR DE TRANSCRIÇÃO <i>ZELDA</i>	16
1.4	HEMÓCITOS E A REGENERAÇÃO	18
1.5	REGENERAÇÃO E AS CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
4.1	OBTENÇÃO DOS BESOUROS E LARVAS	22
4.2	LESÃO DAS LARVAS	22
4.3	EXTRAÇÃO DA HEMOLINFA	22
4.4	COLORAÇÃO AZUL DE TOLUIDINA	23
4.5	PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA	23
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DA HEMOLINFA	24
4.7	VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>ZELDA</i> NAS CÉLULAS DA HEMOLINFA	24
4.8	INJEÇÃO E SILENCIAMENTO VIA RNA DUPLA FITA (DSRNA)	25
4.9	VISUALIZAÇÃO DOS PROCESSOS DE REGENERAÇÃO EM LARVAS CONTROLE E KNOCK-DOWN PARA <i>ZLD</i>	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
5.1	REGENERAÇÃO DAS PERNAS NAS LARVAS DE <i>T. castaneum</i>	27
5.2	CLASSIFICAÇÃO DOS HEMÓCITOS	37
5.3	EXPRESSÃO DO <i>ZLD</i> NOS HEMÓCITOS	39
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de regeneração é um assunto que de longa data intriga os cientistas, motivando-os a pesquisar e compreender seus fenômenos e mecanismos (DINSMORE, 1992). Por definição, a regeneração caracteriza uma habilidade que alguns organismos possuem de restaurar um tecido ou órgão que foi lesionado ou amputado e reconstruí-lo com células que proporcionem a mesma funcionalidade do tecido ou órgão original (Figura 1). A explicação de como, e porque certos organismos tem a capacidade de regenerar praticamente seu corpo inteiro enquanto outros conseguem regenerar apenas alguns tecidos é uma das questões mais intrigantes do campo de pesquisa da medicina e biologia regenerativa, e que até hoje ainda não tem uma resposta completa (REPISO *et al.*, 2011).

Figura 1 - Regeneração e cicatrização

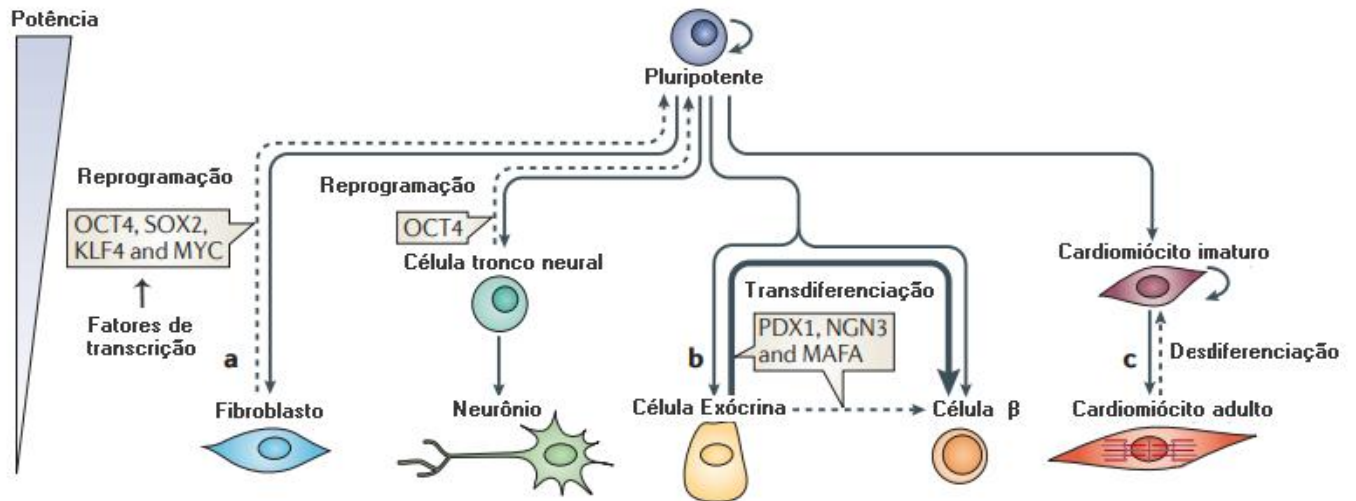


Fonte: Elaborado pelo autor.

Grandes contribuições científicas ao tema vêm sendo realizadas desde o século XVIII. Como evidenciado nos estudos de Abraham Trembley, pioneiro nos estudos de regeneração, através das Hidras, e as descobertas de Lazzaro Spallanzi sobre a regeneração das salamandras e outros organismos (revisto em TSONIS e FOX, 2009; TREMBLEY *et al.*, 1744; OKADA e TOKINDO, 2007).

Desde então muito progresso tem sido realizado neste campo de pesquisa incluindo os possíveis meios pelas quais as novas células do tecido a ser regenerado serão formadas (TANAKA e REDDIEN, 2011). Foi estabelecido, por exemplo, que o tecido regenerado pode ser gerado a partir de células tronco residentes, que são células indiferenciadas pluripotentes, ou seja, que tem a capacidade de se multiplicar e dar origem a novos tipos celulares mais diferenciados (WEISSMAN *et al.*, 2001). Além disso, o tecido regenerado pode advir de células já diferenciadas, visto que há evidências que estas podem realizar processos que estimulem sua regeneração.

Três possíveis mecanismos foram descobertos que podem levar a regeneração (Figura 2), sendo estes: 1) Desdiferenciação, que ocorre quando as células presentes no local da lesão se desdiferenciam em células multipotentes de uma linhagem menos diferenciada, sendo assim, são capazes de se multiplicar, e posteriormente se diferenciar novamente reconstituindo as células perdidas; 2) Transdiferenciação, o qual uma célula de uma linhagem específica se desdiferencia e dá origem a uma célula de uma outra linhagem celular que foi danificada, reconstruindo o tecido; 3) E por fim, a reprogramação celular, que consiste na indução do retorno de uma célula completamente diferenciada a seu estado pluripotente, podendo dar origem a células de qualquer linhagem, estado que pode ser induzido pela presença de fatores de transcrição específicos (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006; JOPLING *et al.*, 2011).

**Figura 2** - Rotas para regeneração celular

**Fonte:** Adaptado de JOPLING *et al.* (2011). **Legenda:** A: Reprogramação, B: Transdiferenciação, C: Desdiferenciação.

Tanto os mecanismos quanto a capacidade regenerativa variam muito de espécie para espécie em animais (BIDEAU *et al.*, 2021). Organismos menos complexos, em geral, têm uma maior capacidade regenerativa. As hidras e os platelmintos, por exemplo, conseguem regenerar seus corpos inteiros utilizando vários mecanismos de regeneração diferentes (PETTER, 2018) ;(REDDY *et al.*, 2019). Também é possível visualizar o processo de regeneração natural em organismos mais complexos, principalmente na regeneração tecidual, como observado na regeneração do tecido cardíaco e das nadadeiras dos peixes, as células no fígado humano e os membros dos anfíbios (REPISO *et al.*, 2011).

### 1.1 REGENERAÇÃO NOS INSETOS

O processo da regeneração em insetos já foi estudado em diversas espécies, muitas das descobertas envolvidas nesse processo inclusive, são relevantes também para comparação com os organismos vertebrados. (MARSH e THEISEN, 1999).

A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), é um organismo modelo da ordem Diptera muito estudado geneticamente, e que ao longo dos anos contribuiu muito para o estudo da biologia do desenvolvimento. Recentemente, estudos nessa espécie também tem contribuído para a elucidação do processo da regeneração, particularmente nas estruturas derivadas dos discos imaginais. Células

derivadas dos discos imaginais dão origem a diversos tecidos da mosca adulta, incluindo antenas, asas e pernas, e possuem capacidade regenerativa. Esta capacidade torna o disco imaginal desta mosca um modelo interessante para estudos regenerativos (FOX *et al.*, 2020). Através de técnicas de manipulação genética e lesões específicas neste organismo, os estudos conseguiram desvendar alguns dos mecanismos e fatores necessários para regeneração tecidual (REPISO *et al.*, 2011).

Já o besouro *Tribolium castaneum* (*T. castaneum*) é um inseto da ordem Coleoptera que, assim como a *D. melanogaster*, passa por uma metamorfose completa (holometabolo), tendo, portanto, estágios larvais e adultos totalmente distintos morfologicamente. Suas larvas têm capacidade de regenerar seus apêndices após uma lesão seguidas de uma ou duas mudas. Porém uma vez em estágio de pupa ou adulto, o *T. castaneum* não é mais capaz de regenerar seus apêndices (LEE *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2011). Devido ao seu ciclo de vida curto, disponibilidade de genoma completo sequenciado e a possibilidade de realizar diminuição de expressão gênica (*knockdowns*) de genes através de RNA de interferência o *T. castaneum* torna-se um modelo completo para estudos regenerativos envolvendo perturbações genéticas (RICHARDS *et al.*, 2008; TOMOYASU e DENELL, 2004). Sendo assim, já existem na literatura estudos que buscam investigar a importância de determinados fatores de transcrição nesse processo regenerativo, fatores como o *abrupt* (*ab*), *dachshund* (*dac*), *distal-less* (*dll*), *spineless* (*ss*) (LEE *et al.*, 2013), e também vias de sinalização como a via do *hedgehog* (*hh*) neste besouro. (VILLAREAL *et al.*, 2015).

Outros insetos também compartilham essa habilidade de regenerar as estruturas dos membros como as ninfas de insetos hemimetábolos, baratas e grilos, por exemplo (NAKAMURA *et al.*, 2008). A partir destes modelos foram descritos também diversos estudos que nos trazem informações importantes sobre os fatores de transcrição e vias de sinalização envolvidas nesse processo (BANDO *et al.*, 2018).

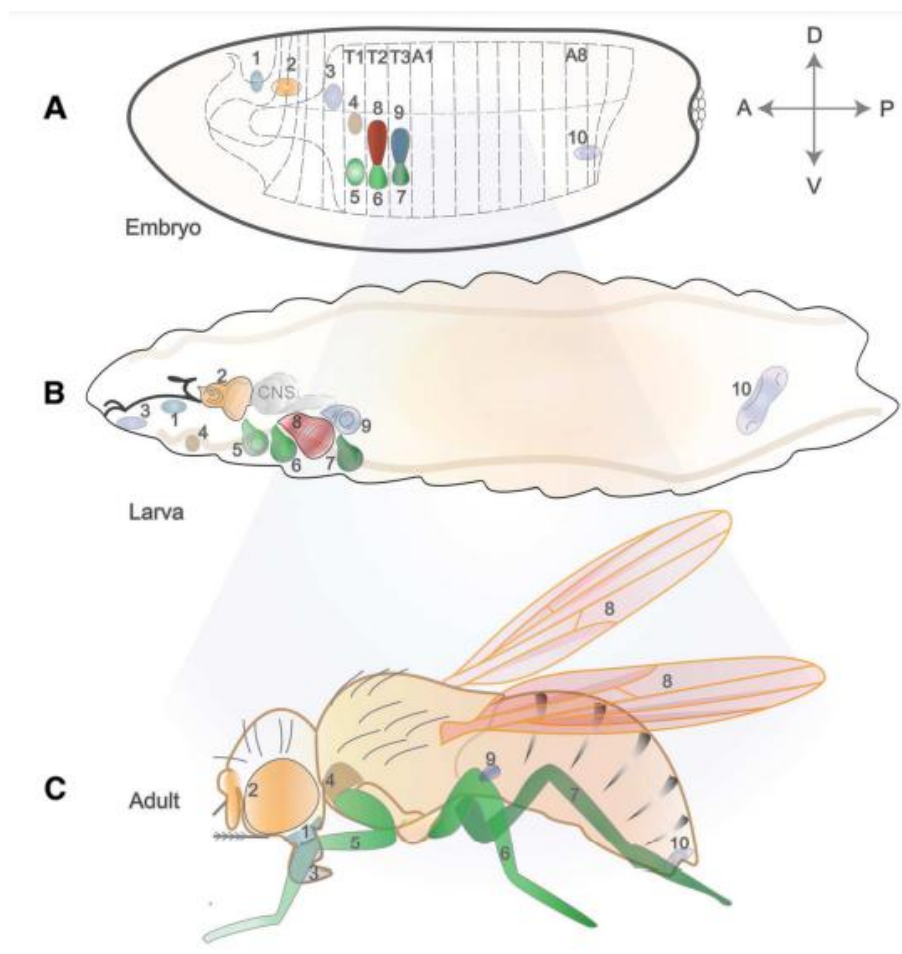
## 1.2 FORMAÇÃO DAS PERNAS NOS INSETOS

Os insetos podem ser divididos de uma maneira geral em dois grandes grupos de acordo com sua metamorfose, os insetos holometábolos, que como comentado anteriormente, realizam uma metamorfose completa com todos os estágios completos e bem diferentes entre si morfologicamente, e os insetos hemimetábolos, que não

possuem um estágio de pupa de transição entre a larva e o adulto, tendo as larvas ao eclodirem uma boa semelhança com o inseto adulto (HYDEYO *et al.*, 2000).

Em relação ao desenvolvimento das pernas, os dois grupos em geral apresentam mecanismos diferentes de formação das pernas. Nos holometábolos, como a *D. melanogaster*, o desenvolvimento ocorre a partir de uma estrutura chamada disco imaginal (Figura 3), um tecido que origina os apêndices externos (antenas, pernas, asas, olhos) no inseto adulto. Em seu estágio larval esse aglomerado de células em forma discoide fica protegido dentro da larva onde cresce e se padroniza, até que chegue a metamorfose, onde os discos se deslocam para formar os apêndices adultos (Figura 3C) (FRISTROM e RICKOLL, 1982).

**Figura 3** - Discos imaginais *D. melanogaster*

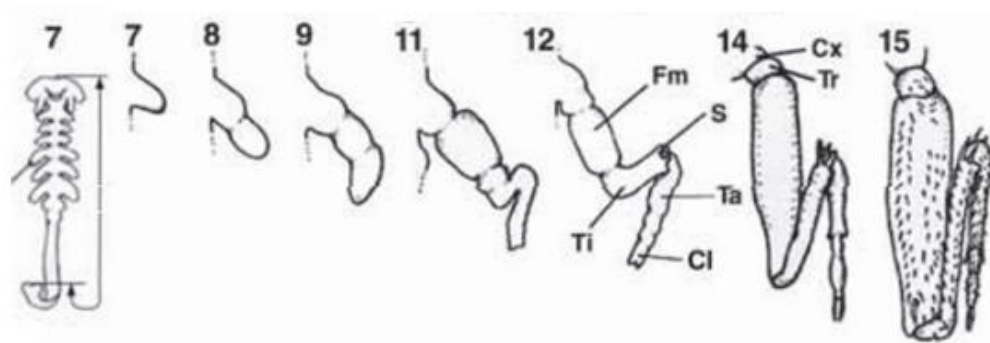


**Fonte:** Adaptado de BEIRA e PARO (2016) **Legenda:** Discos imaginais da *D. melanogaster* em A: embrião, B: Larva, C: Mosca adulta, com as respectivas estruturas originadas dos discos.



Nos insetos hemimetábolos, como o *Gryllus bimaculatus*, o crescimento das pernas se dá através do crescimento a partir de um brotamento do embrião (Figura 4) (NIWA, *et. al.*, 2000).

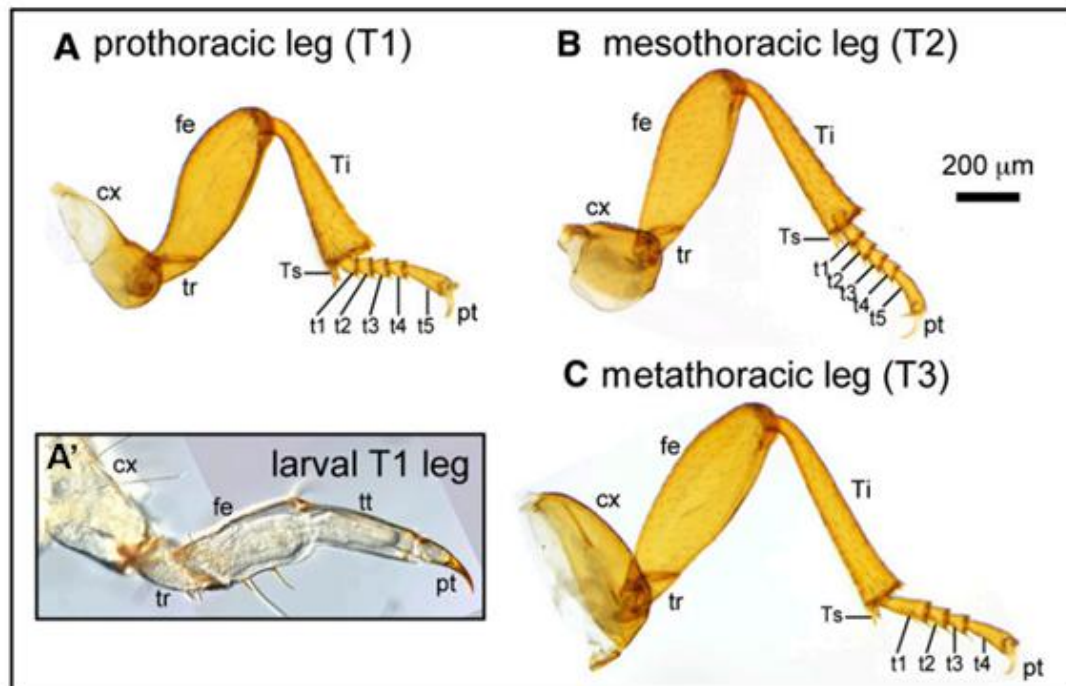
**Figura 4** - Formação das pernas do *Gryllus bimaculatus*.



**Fonte:** Adaptado de NIWA *et. al.* (2000). **Legenda:** Sequência de evolução do desenvolvimento das pernas a partir do brotamento no embrião do *Gryllus*, Fm, fêmur; Ti, tíbia; S, esporão tibial; Ta, tarso; Cl, garra; Cx, coxa; Tr, trocanter.

O *Tribolium castaneum* apesar de ser um inseto holometábolo, não segue o mesmo padrão de desenvolvimento dos membros da *D. melanogaster*, esse inseto segue um modelo de padronização ancestral, comum a diversos outros insetos e vertebrados, suas larvas apresentam apêndices externos com alta complexidade estrutural como as pernas (Figura 5 A') e as antenas. Sendo assim, os membros dos adultos se desenvolvem a partir de pernas já presentes nas larvas com estruturas bem definidas. (Figura 5) (ANGELINI, *et al.*, 2012) (SCHRÖDER, *et al.*, 2008).

**Figura 5** - *T.castaneum*, estruturas dos membros das larvas e adultos



**Fonte:** Adaptado de ANGELINI *et al.* (2012). **Legenda:** A: Perna protorácica do adulto; B: Mesotorácica, C: Metatorácica. A': Perna da larva segmento T1; T1-3, segmentos torácicos; cx, coxa; tr, trocanter; fêmur tt, tibiotarso; pt, pretarso; ti, tíbia; ts, esporão tibial; t1-5, tarsômeros;

### 1.3 FATOR DE TRANSCRIÇÃO *ZELDA*

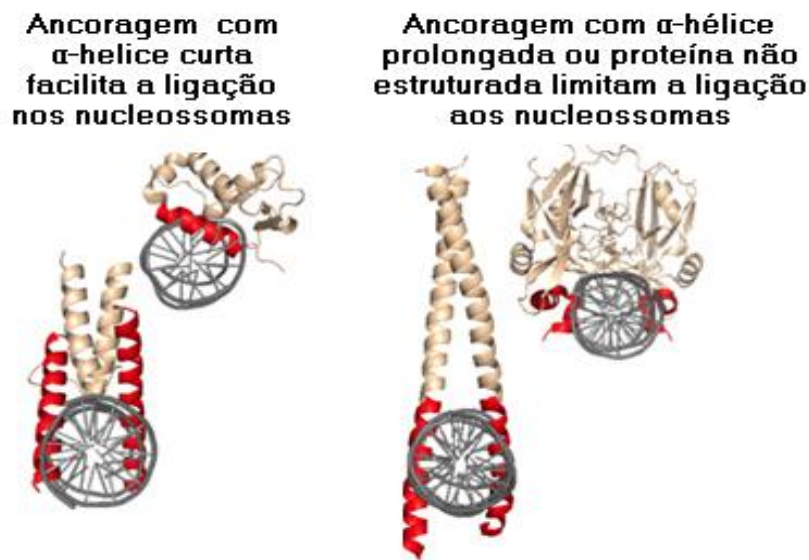
Os fatores de transcrição (FTs) são proteínas que têm a capacidade de ativar ou desativar a expressão de seus genes alvo, fazendo parte então de uma rede regulatória de genes. Os FTs agem se ligando em sítios específicos no DNA, preferencialmente perto da região dos genes que regulam (NOWICK e STUBBS, 2010).

O gene *zelda* (*zld*), que atua como um FT, codifica uma proteína dedo de zinco, que desempenha diversas funções importantes, e está presente apenas no grupo dos Pancrustacea (insetos+crustáceos) (RIBEIRO *et al.*, 2017). Na *D. melanogaster*, por exemplo, ele está envolvido na transição materno-zigótica, organização do citoesqueleto, celularização, formação da banda germinal, padronização, determinação do sexo e biogênese de micro RNAs (LIANG *et al.*, 2008). Também foi sugerido que participa do desenvolvimento do disco imaginário da asa da larva de *D. melanogaster* (GIANNIOS e TSITILLOU, 2003).

No *T. castaneum* o *zld* mantém suas funções de transição materno-zigótica, e dispõem de outras funções importantes como a regulação da segmentação da zona de crescimento posterior durante a embriogênese, e também a padronização de estruturas pós embriogênicas derivadas dos discos imaginais, tais quais as asas, antenas e pernas (RIBEIRO *et al.*, 2017). Em geral, *zld* é expresso em populações celulares progenitoras e indiferenciadas, tais como os energideos, que são os núcleos em divisão rápida encontrados nas primeiras horas do desenvolvimento embrionário, e neuroblastos, sugerindo que *zld* poderia apresentar um papel em populações celulares progenitoras (RIBEIRO *et al.*, 2017); (LARSON *et al.*, 2021).

É importante destacar também que o *zld* retém características de um fator de transcrição pioneiro, ou seja, retém características específicas, como por exemplo a estrutura secundária de suas proteínas (Figura 6) que lhe proporcionam se ligar no DNA nucleosomal (SUN *et al.*, 2015) e modular a acessibilidade da cromatina a outros FT não pioneiros para que se liguem no DNA (SCHULZ *et al.*, 2015). Somado a este fato, foi demonstrado no estudo de Garcia *et al.* (2019) que ele é capaz de se ligar diretamente nos nucleossomas, assim como os fatores de transcrição humanos, o que suporta a hipótese de que o *zld* pode ter um papel importante como fator que induz reprogramação celular em diversos organismos, o que o torna um alvo interessante para investigar esse processo nos animais (GARCIA *et al.*, 2019).

**Figura 6** - Estrutura dos fatores de transcrição pioneiros



**Fonte:** Adaptado de: (GARCIA *et. al.*, 2019).

#### 1.4 HEMÓCITOS E A REGENERAÇÃO

Hemócito (HCT) é um termo criado para referenciar as células que circulam a hemolinfa de determinados animais, estas células se assemelham às células sanguíneas e desempenham funções vitais para o organismo, uma das mais importantes é o seu papel na defesa imune dos insetos, sendo conhecidas também como células do sistema imune (LAVINE e STRAND, 2002). Os HCTs desempenham funções como a fagocitose e encapsulamento de patógenos estranhos ao organismo. (STRAND e PECH, 1995).

Durante o processo de regeneração epimórfica (regeneração funcional dos órgãos e tecidos) é comum que possa ocorrer a formação de um blastema, termo que dá nome a um conjunto de células tipo progenitoras que aparecem no local da lesão, dando início aos processos de divisão, diferenciação e reorganização celular para restauração do tecido (BROCKES e KUMAR, 2008; STEWART e STANKUNAS, 2012). A origem das células que formam o blastema ainda não é bem conhecida, e uma das teorias utilizadas para explicar sua origem é a desdiferenciação de células adultas (SLACK, 2006). Sendo assim, os HCTs são um tipo celular interessante neste processo, tendo em vista suas relações próximas com a lesão tecidual.

A literatura mostra que em alguns organismos vertebrados, os macrófagos, células do sistema imune, tem um papel importante na regeneração do tecido através da desdiferenciação dessa linhagem celular, como pode ser visto no processo regenerativo do peixe-zebra (zebrafish) e das salamandras (STEWART e STANKUNAS, 2012; JOVEN *et al.* 2019). Dentre os HCTs, os plasmatócitos são células fagocíticas que mais se assemelham aos macrófagos dos vertebrados devido sua função no organismo (GOTTO *et al.*, 2003), podendo assim ter papéis semelhantemente importantes na regeneração. É visto na literatura que no grilo *Gryllus bimaculatus* a depleção dos plasmatócitos resulta em problemas na regeneração e também uma proliferação mais lenta durante a regeneração das pernas desse organismo (BANDO *et al.*, 2021). Um outro estudo sugere que os hemócitos desempenham um papel fundamental na regeneração das células-tronco germinativas da *D. melanogaster* através do processo desdiferenciação (VARGA *et al.*, 2020).

Em relação ao *T. castaneum* não há na literatura uma identificação dos tipos celulares que circulam na hemolinfa, nem estudos que os associam ao processo de regeneração. Porém estas células podem desempenhar papéis importantes no processo de regeneração como foi mostrado, e por isso tornam-se bons alvos para estudo.

## 1.5 REGENERAÇÃO E AS CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Os mamíferos são conhecidos por terem uma baixa capacidade regenerativa, o que leva à um grande interesse em potencializar essa habilidade. Sendo assim, diversos estudos buscam desvendar o processo regenerativo nesse grupo, por exemplo, estudos *in vitro* mostram que existem semelhanças anatômicas e moleculares na regeneração fetal das pontas dos dedos humanos e de ratos (MUNEOKA e SASSOON, 1992). Além disso, estudos genéticos sobre a regeneração dos dedos nos ratos também demonstram que há semelhança nas vias de sinalização utilizadas para o processo de regeneração em vertebrados menores, representando como a pesquisa básica de organismos mais simples pode trazer informações importantes para a compreensão do processo em organismos mais complexos (MUNEOKA *et al.*, 2008).

As ferramentas de biologia molecular aplicadas nesse trabalho são comparáveis as utilizadas na genética humana. O uso dessas técnicas de engenharia genética vem sendo utilizado cada vez mais na biotecnologia farmacêutica, permitindo diagnósticos mais precisos, novos alvos terapêuticos e terapias direcionadas, como a terapia genética, uma terapia em desenvolvimento, que pode inserir genes nas células do paciente para combater alguns tipos de doença (ALTER *et al.*, 2020).

Um exemplo de terapia em desenvolvimento aplicando as tecnologias farmacêuticas pode ser visualizada através de uma série de estudos que utilizam um sistema de entrega de micro-RNAs através de nanopartículas. Os micro-RNAs constituem um grupo de pequenos RNAs regulatórios que participam de diversos processos como: metabolismo, diferenciação, proliferação e morte celular, e também exercem influência na progressão de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, câncer e outros, tornando-se alvos importantes para terapias genéticas de regeneração tecidual e outras desordens (LEE *et al.*, 2019); (YI *et al.*, 2016).

Com esses e outros avanços na medicina a qualidade de vida vem aumentando ao longo dos anos, conseqüentemente ocorre o envelhecimento da população, e o aumento no número de doenças crônicas e condições degenerativas advindas da idade que são de difícil tratamento (WERNER *et al.*, 2011). Sendo assim, cada vez mais se vê a necessidade de procurar por terapias mais eficientes para problemas como: doenças cardíacas, câncer, derrames, diabetes *mellitus* e outros distúrbios, que podem recorrer a medicina regenerativa como uma alternativa de terapia (KARATHANASIS, 2014).

Desse modo, o interesse das grandes companhias farmacêuticas no ramo da medicina regenerativa vem aumentando cada vez mais, e altos valores são investidos em pesquisas nesse ramo por essas companhias atualmente. A empresa brasileira Libbs farmacêutica, por exemplo, em 2019 investiu um total de US\$1 milhão em pesquisas sobre regeneração do tecido cardíaco (ICQT, 2019).

## 2 JUSTIFICATIVA

Visando compreender e manipular o processo de regeneração para fins de aplicação biomédica, é necessário desvendar a base genética envolvida neste processo. Investigar a regeneração em animais mais simples, como os insetos, e aplicá-las aos mais complexos como nós humanos é um importante passo a longo prazo.

Nesse contexto, o trabalho busca mostrar que o besouro *T. castaneum* pode ser um organismo modelo interessante para pesquisa dos processos regenerativos, além de aprofundar os conhecimentos sobre a regeneração, sua regulação genética e celular neste organismo. Além disso, o estudo demonstra ser pioneiro quanto à abordagem de classificação morfológica das células da hemolinfa do *T. castaneum*, o que agrega uma importância a mais ao mesmo, podendo abrir portas para corroborar as informações dispostas na literatura.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Possibilitar uma maior compreensão do processo de regeneração de membros no *T. castaneum* e identificar se o FT *zld* desempenha alguma função nesse processo.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar através de knockdown por RNAi a importância do gene *zld* no processo de regeneração dos apêndices nos besouros.
- Caracterizar e classificar os hemócitos do besouro *T. castaneum* como células possivelmente envolvidas na regeneração dos apêndices.
- Verificar a expressão do gene *zld* nos hemócitos do besouro.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DOS BESOUROS E LARVAS

Os besouros e larvas utilizados foram mantidos na farinha em recipientes de plástico com aproximadamente 150 gramas de farinha de trigo da marca três coroas, em uma estufa a 30 °C com umidade relativa de aproximadamente 45%. As larvas para acompanhamento do desenvolvimento/injeção foram obtidas através de oviposição no tempo de 0 a 6 horas a fim de regular o estágio larval geral do grupo.

### 4.2 LESÃO DAS LARVAS

Nas larvas entre os estágios L4 e L5 selecionadas a partir da oviposição controlada, as pernas do meio e a traseira foram removidas na altura da coxa apenas no lado esquerdo da larva. Para a remoção as larvas foram posicionadas em uma fita dupla face colada em uma placa de petri de plástico. Após serem anestesiadas no gelo por cerca de 2 minutos as pernas foram cortadas utilizando um par de pinças finas e o auxílio da lupa.

As pernas dianteiras e as contralaterais do meio e traseiras serviram de controle para análise da regeneração conforme previamente descrito por Lee *et al.* (2013). Após serem lesionadas, as larvas foram imediatamente separadas em um novo recipiente com farinha e levadas de volta à estufa.

### 4.3 EXTRAÇÃO DA HEMOLINFA

As larvas foram separadas dos besouros com o auxílio da peneira granulométrica, sendo selecionadas larvas em estágios avançados como L6, L7, para que a quantidade de material celular fosse maior. Após peneiradas, dez larvas foram separadas e lavadas rapidamente em água destilada para retirada de qualquer resíduo de farinha. Protocolo adaptado de (DAMRAU *et al.*, 2018), dois microtubos foram separados, um de 1,5 mL (com a tampa removida) e outro de 0,5 mL. No microtubo de 0,5 mL foi feito com o auxílio de um bisturi um pequeno corte transversal no fundo, e posteriormente feito o encaixe do microtubo de 0,5 mL (menor) dentro do microtubo de 1,5 mL. (maior)

Ao fundo do microtubo maior (1,5 mL) foi adicionado 100 uL de uma solução



anticoagulante de citrato (98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 41 mM Ácido cítrico, 10 mM feniltiourea) (MANACHI *et al.*, 2010) para que as células da hemolinfa não aglutinassem. Com auxílio de uma pinça foi realizado um pequeno corte no abdômen das larvas, em seguida estas foram posicionadas no interior do microtubo menor (0,5 mL). Após lesionadas e posicionados os microtubos, o conjunto foi levado à microcentrífuga de analógica KASVI e centrifugado a 6400 RPM por 30 segundos para que assim a hemolinfa saísse das larvas do *T. castaneum* e passasse do microtubo menor para o maior contendo a solução anticoagulante de citrato. O sobrenadante foi descartado e um precipitado com a hemolinfa foi formado

#### 4.4 COLORAÇÃO AZUL DE TOLUIDINA

A partir do procedimento de extração de hemolinfa descrito anteriormente o precipitado com a hemolinfa foi re-suspenso em 300 uL de PBS 1x (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ph= 7.4), em seguida foram transferidos 50 uL para uma lamínula em uma placa de seis poços. As células aderiram por 30 minutos e depois foram lavadas com PBS 1x para retirar as células que não aderiram, as células remanescentes foram fixadas com 200 uL de paraformaldeído 4% durante 15 minutos. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas novamente em PBS 1x três vezes para remover o excesso de PFA e após essa lavagem, uma vez em água destilada para remover o sal do PBS. Seguindo para coloração com azul de toluidina (Sigma-Aldrich) (MANACHI *et al.*, 2010) duas gotas do corante em solução aquosa filtrada a 1% foram despejadas nos poços das lamínulas uma por vez, mantendo-o por 20 segundos. Em seguida, a lamínula foi retirada com auxílio de uma agulha e pinça, e posteriormente lavada com água destilada. Após a lavagem as lamínulas foram posicionadas em uma placa de aquecimento para secar. Depois de secas, uma gota de Entellan™ (107960-Sigma) foi utilizada para fechar a lamínula na lâmina, estando prontas as lâminas foram armazenadas em uma caixa para posterior observação.

#### 4.5 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A partir do precipitado de células formado no fundo do microtubo durante a extração da hemolinfa o mesmo foi fixado com 2,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, dissolvido em água durante 2 horas. Após esse processo

foram lavados com água por 3 vezes, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Os hemócitos foram então pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) durante 2 horas e desidratados através de uma série graduada de acetona de 30%-100%, e em seguida embebidos em resina Epoxi Epon 812 (46346-Sigma). Após a polimerização em resina pura, os cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos no ultramicrotomo (Leica EM UC7) e depositados em grades de níquel, contrastados com 5% de acetato de uranila por 20 minutos e 1% de citrato de chumbo por 3 min. Os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1011) operado a 80 kV pertencente a Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (BARROS *et al.*, 2008).

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DA HEMOLINFA

A caracterização das células circulantes na hemolinfa do *T. castaneum* foi realizada a partir de uma análise comparativa da morfologia celular (LAWRENCE, 2008). Artigos publicados de outros organismos próximos foram utilizados como base para caracterização das células, pois não há nenhum artigo que aborda os diferentes tipos de células da hemolinfa desse animal. Para identificação foram utilizadas características como: forma, tamanho celular, tamanho do núcleo, presença de grânulos e inclusões, núcleo, citoplasma entre outras. O programa Image J versão 1.51p foi utilizado para medir os parâmetros celulares.

#### 4.7 VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ZELDA* NAS CÉLULAS DA HEMOLINFA

Cerca de 5 larvas, 100 mg de embriões ou o precipitado formado pela extração da hemolinfa foram homogeneizados em 1 mL de TRizol® (Invitrogen 15596026) e feita a maceração da amostra com posterior centrifugação a 12.000G 4° C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 200 uL de clorofórmio para realizar a extração do RNA agitando bem e depois descansando em temperatura ambiente por 2-3 minutos até visualizar a separação de fases no micro tubo, que posteriormente fora centrifugado novamente a 12.000G 4° C por 15 minutos. A fase superior transparente fora separada para utilização e o restante descartado em seu devido local, sempre mantendo no gelo as amostras quando não manuseadas. Subsequentemente foi feita a adição 250 uL de isopropanol a fase transparente separada para precipitação RNA, feita a

homogeneização com um agitador de bancada tipo vórtex e uma centrifugação na mini centrífuga. Os tubos foram levados ao freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  por 3 horas ou ao  $-80^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, quando removidos descansados em temperatura ambiente por 10 minutos e feita adição de 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% em cada amostra, e uma nova centrifugação a  $12.000\text{G}$   $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de etanol 75%, repetindo a centrifugação nas mesmas condições e novamente descartado o sobrenadante, os microtubos foram posicionados sobre uma folha de papel para que o máximo do álcool fosse eliminado. O RNA agora precipitado fora diluído em 20  $\mu\text{L}$  de água para injeção, homogeneizado e levado para quantificação no Nanodrop. A partir da concentração de RNA encontrada foi feito um cálculo e 2 microgramas de RNA foram utilizados para sintetizar o DNA complementar, (cDNA) utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814-Applied Biosystems™) foi confeccionado o master mix com os componentes do kit que foi misturado a amostra de RNA, conforme o protocolo do fabricante a reação levada ao termociclador com as condições pré-estabelecidas pelo fabricante. Com o cDNA pronto foi feito um processo amplificação utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR), onde fora montada uma reação de 25  $\mu\text{L}$  utilizando o kit GoTaq® Colorless Master Mix, (M7132- Promega) seguindo também o protocolo de uso do fabricante. Após montada a reação foi levada ao termociclador com a seguinte programação: Desnaturação – 2 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . Ciclos (35) – 1<sup>o</sup>: 30 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$ ; 2: 30 segundos a  $57^{\circ}\text{C}$ ; 3: 40 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Extensão – 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Os primers do *zld* e outros genes de interesse como controle foram utilizados nessa reação. O resultado do PCR foi visualizado em uma eletroforese em gel de agarose 1% corada com corante safer (K9-16C-Kasvi), em uma cuba de eletroforese modelo MiniRun GE-100 utilizando uma corrente de 100V e tampão TAE (Tris base, ácido acético e EDTA diluído a 0.5 X. Foi utilizado um padrão de peso molecular, gentilmente fornecido pelo Prof. José Nepomuceno, que consiste em um plasmídeo pUC19 digerido com a endonuclease de restrição *TaqI* gerando fragmentos nos tamanhos: 1444 pb, 736 pb, 476 pb. Sendo assim, foi possível separar as bandas e verificar se houve amplificação e conseqüentemente expressão ou não dos genes.

#### 4.8 INJEÇÃO E SILENCIAMENTO VIA RNA DUPLA FITA (DSRNA)

O dsRNA utilizado neste trabalho foi sintetizado pelo pós-doutor Lupis Ribeiro,

sendo utilizado conforme literatura para produzir o efeito do silenciamento gênico nas larvas de *T. castaneum* (TOMOYASU e DENELL, 2004). As larvas foram selecionadas entre os estágios L4 e L5, e injetadas utilizando um micro injetor Nanoinject II instrument (Drummond Scientific Company), que utiliza uma agulha fabricada a partir de um capilar de vidro com 3.5” de comprimento e 0.020” de espessura (Drummond Scientific Company- 3-000-203-G/X) feito por aquecimento, alongamento e ruptura na máquina P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument CO.). As larvas foram injetadas na porção abdominal 3 vezes com 69 nanolitros, ou seja, 0,2 microlitros por larva, com as soluções RNA dupla fita de *zelda* (*dszld*), concentração = 1µg/µL, com PBS 1X ou um RNA dupla fita não relacionado o (*dsneo*), concentração = 1µg/µL. Após injetadas as 120 larvas (60 de cada grupo) foram recolocadas em seus recipientes de plástico com farinha e posicionadas na estufa. Dois dias após a injeção foi feita a remoção das pernas das larvas seguindo a metodologia de lesão previamente descrita neste trabalho (4.2), e então foram levadas novamente a estufa, onde periodicamente eram retiradas para observar e fotografar o seu desenvolvimento e progressão da regeneração.

#### 4.9 VISUALIZAÇÃO DOS PROCESSOS DE REGENERAÇÃO EM LARVAS CONTROLE E KNOCK-DOWN PARA *ZLD*

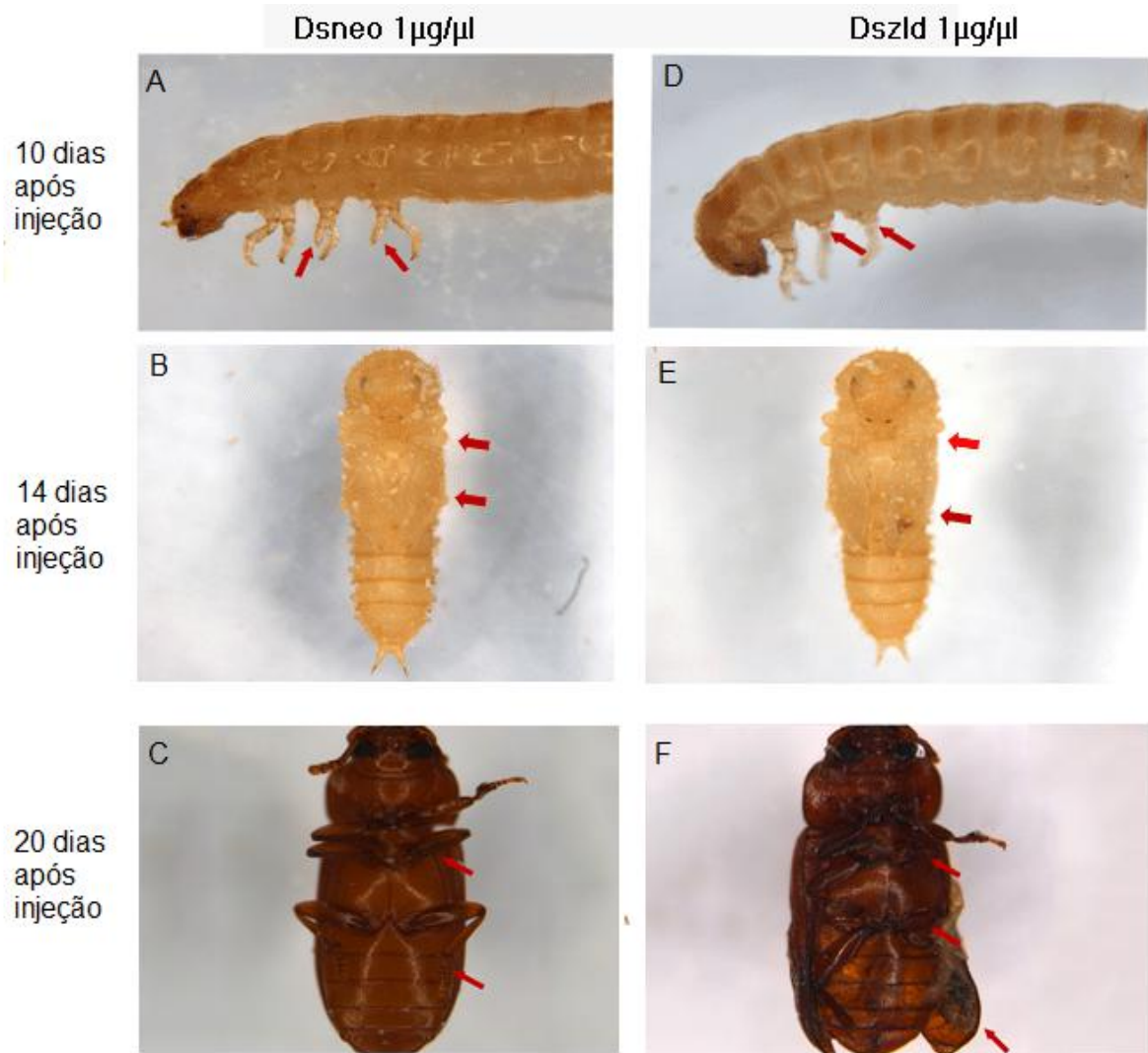
As larvas foram posicionadas em uma placa de Petri e levadas ao estereoscópio Leica modelo M205, onde foram capturadas fotos e vídeos das larvas. A escala foi medida no software da lupa Leica AF Lite, as tabelas e os ajustes foram realizados com o Photoshop CS5. Para captura das imagens foi utilizado gelo ou éter para diminuir a movimentação das larvas, e desse modo foram feitas as fotos para análise dos fenótipos e estruturas. Ainda assim, os adultos e um grupo amostral de larvas fora fixado em PFA 8% durante 24 horas para realização de fotos multifocais.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 REGENERAÇÃO DAS PERNAS NAS LARVAS DE *T. castaneum*

No presente trabalho foi estabelecido o modelo de injeção de RNAs dupla-fita (dsRNA) em larvas L5 seguida de retirada de duas pernas (segunda e terceira perna) da mesma. Como controle foi utilizado a injeção de um dsRNA (*dsneo*) e PBS 1X.

As larvas silenciadas para *zld* (*dszld*) não conseguiram regenerar de forma significativa nos membros ao longo de todo o processo de metamorfose. Por outro lado, no grupo controle a regeneração foi completa (Figura 7). Porém um empecilho ocorreu nesse experimento, inicialmente partiu-se da injeção de trinta larvas, tanto no grupo controle quanto no grupo *zld*. Durante os processos de lesão para remoção das pernas, injeção, e metamorfose muitos dos indivíduos morreram, chegando ao estágio final adulto apenas cinco besouros do grupo *dszld* e oito do grupo controle, porém todos os besouros sobreviventes sob efeito do RNAi para *zld* não regeneraram suas pernas enquanto os controles regeneraram, incentivando a continuidade da pesquisa.

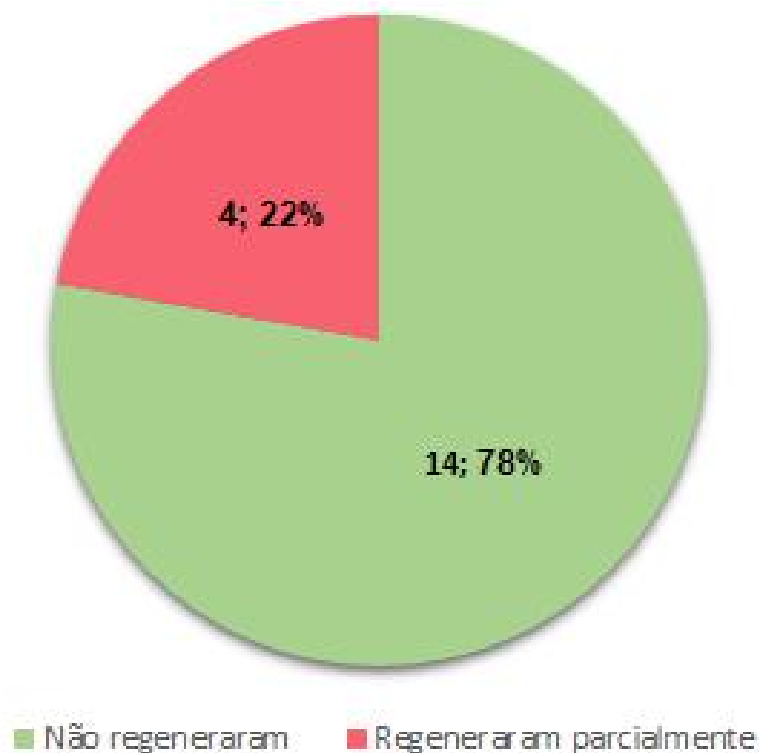
**Figura 7** - Resumo do primeiro experimento de regeneração

**Legenda:** A, B e C, pupa e besouro do grupo controle, injetados com Dsneo. D, E e F, injetados com o Dszld. Setas vermelhas sinalizam a evolução da regeneração das pernas amputadas.

No segundo experimento, realizado a fim de contornar o problema de mortalidade encontrado inicialmente, o número de animais utilizados foi dobrado injetando-se 60 larvas para cada grupo (controle e *zld* RNAi), totalizando 120 animais. Desse modo, foi obtido um número maior de sobreviventes ao fim da metamorfose, 18 besouros do grupo *dszld* e 30 do grupo controle. Dentre os besouros que completaram a metamorfose no grupo *dszld* 78% deles não apresentaram nenhum indício de regeneração, e 22% apresentaram algum tipo de regeneração parcial (Gráfico 1). Uma possível explicação para esse fenômeno pode ser a própria variabilidade do silenciamento via RNAi através do processo de injeção, de maneira que uma concentração de dsRNA inferior que seja injetado no organismo das larvas

pode gerar um fenótipo menos acentuado do silenciamento. Já dentre os organismos sobreviventes do grupo controle todos apresentaram uma regeneração satisfatória dos seus membros.

**Gráfico 1** - Besouros *dszld* ao fim da metamorfose

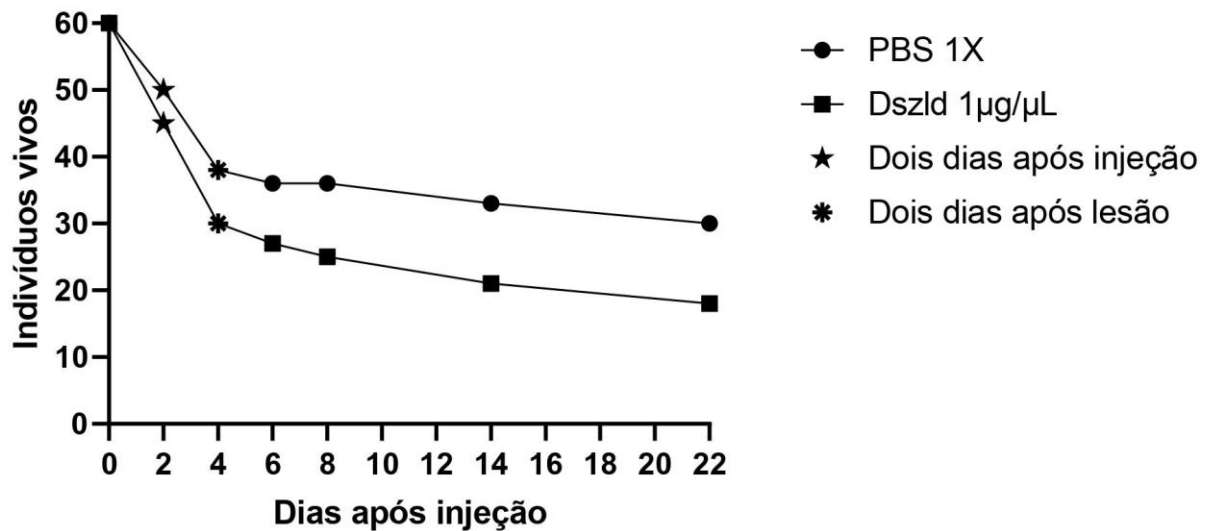


**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Neste experimento, ainda foi obtido um baixo percentual de sobrevivência dos indivíduos ao final do processo de metamorfose e regeneração, 50% no grupo controle ( $n=30/60$ ) e 30% no grupo *dszld* ( $n=18/60$ ), sendo os maiores picos de mortalidade justamente nos dias subsequentes aos procedimentos invasivos, à injeção e ao procedimento de lesão para remoção das pernas das larvas (Gráfico 2). Nota-se também que o grupo controle de maneira geral manteve um percentual sobrevivência maior e percebe-se que ao decorrer do processo de metamorfose os indivíduos do grupo *dszld* aparentam ter um percentual de mortalidade um pouco mais elevado (Figura 10 *dszld*). Uma potencial maneira de explicar esses dados é que como *zld* está envolvido em outros processos importantes na metamorfose do *T. castaneum*, de modo que sua ausência dificulta o processo de muda por exemplo (RIBEIRO *et al.*, 2017), o que pode influenciar na sobrevivência das larvas *dszld* comparadas ao grupo

controle. Porém, em conjunto com os animais do experimento anterior, os resultados formam uma amostra com tamanho interessante para a investigação da interferência do *zld* no fenômeno da regeneração dos apêndices.

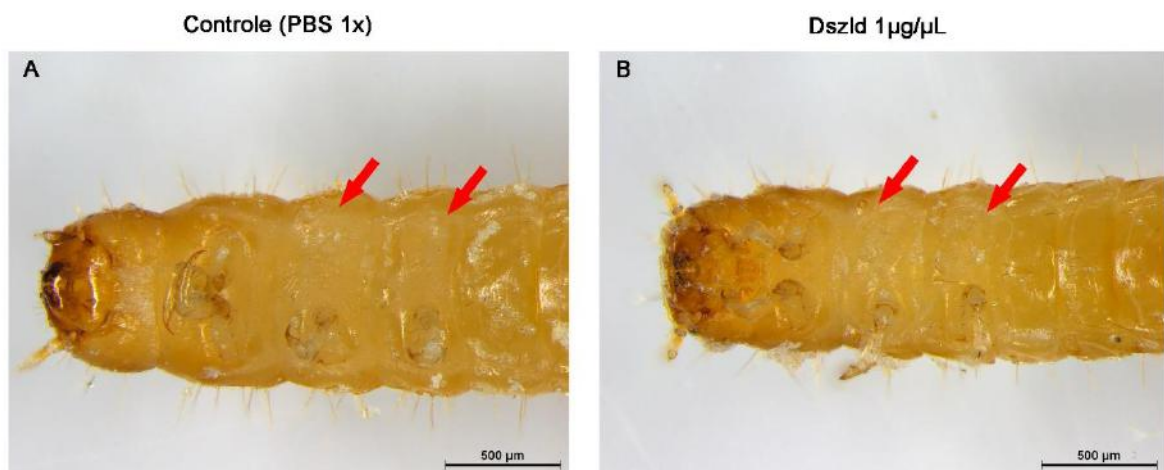
**Gráfico 2** - Sobrevivência dos indivíduos ao longo da metamorfose



Fonte: Elaborado pelo autor.

A fim de notar se haveria alguma diferença no processo cicatrizante do grupo controle x *dszld*, um dia após o processo de lesão as larvas foram fotografadas. Foi observado que ocorre uma cicatrização satisfatória do local em ambos os grupos (Figura 8A e 8B) não sendo possível notar diferenças ainda entre estes.

**Figura 8** - Larvas 3 dias após a injeção

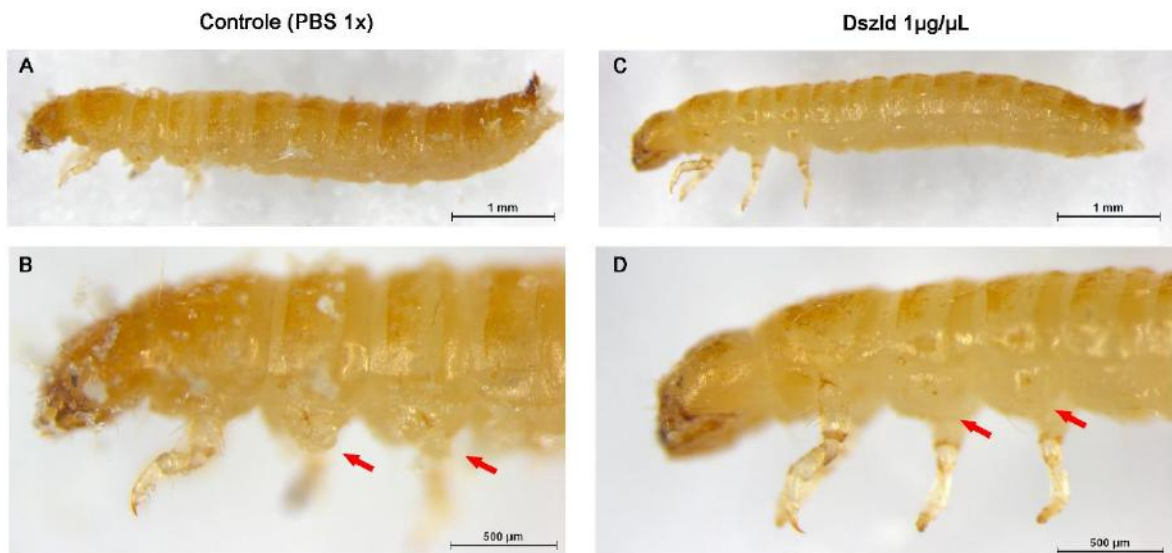


**Legenda:** Larvas com as pernas do meio e traseira de um dos lados removidas, após serem injetadas com PBS 1x (A) e dsRNA *zld* (B) um dia após a lesão. Setas vermelhas indicando o local da lesão.



Em contraste, seis dias após a injeção, quando as mudas entre os estágios larvais começam a ocorrer, já é possível notar diferenças entre os grupos experimentais. Nas larvas controle, pode ser observado um brotamento de um coto característico (SHAH, NAMIGAI *et al.* 2012), indicando um início do processo de regeneração (Figura 9B), enquanto que no grupo das larvas silenciadas do *zld* esta estrutura não foi visualizada (Figura 9D).

**Figura 9** - Larvas 6 dias após injeção

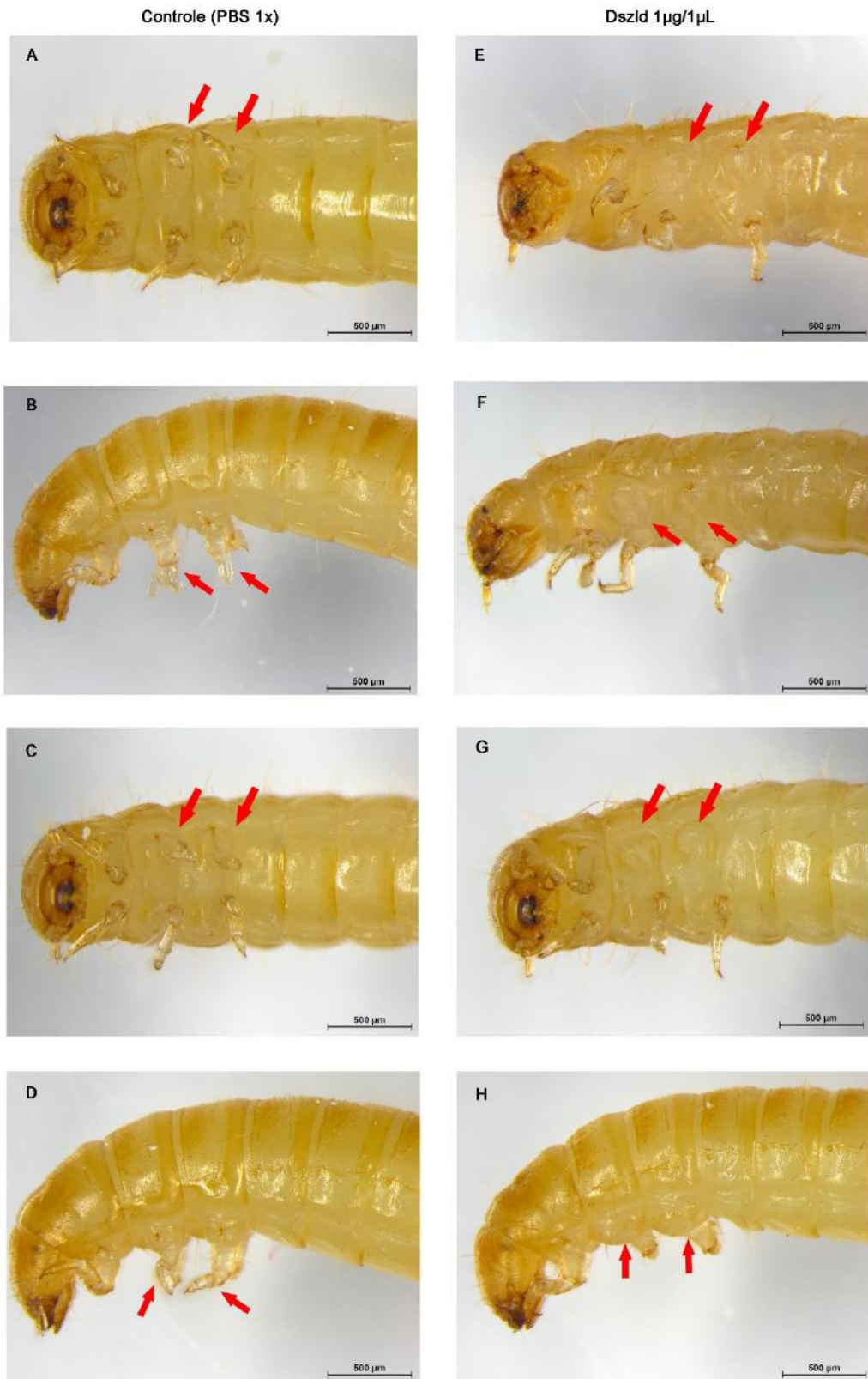


**Legenda:** Duas larvas 4 dias após lesão, em aumentos diferentes, com as pernas do meio e traseira de um dos lados removidas, após serem injetadas com PBS 1x (A e B) e dsRNA *zld* (C e D). Setas vermelhas indicando o local da lesão.

Continuando na evolução do processo de metamorfose, é possível observar uma diferença notável do processo de regeneração entre os grupos experimentais 10 dias após a injeção. Nas larvas controle é possível notar o brotamento das estruturas das coxas, trocanter, fêmur e tibiotarso (ANGELINI *et al.*, 2012) (Figura 10 A/B, C/D). Essa evolução da regeneração no grupo controle é esperada nos insetos tipo selvagem (LEE *et al.*, 2013). Já nas larvas silenciadas para *zld* (Figura 10 E/F e G/H) não foi possível notar o brotamento de estrutura alguma dos apêndices, assemelhando-se ainda a progressão mostrada na Figura 8A e 8B. A amostra das larvas que foi utilizada na figura 10 foi fixada utilizando o PFA 8% pelos seguintes motivos: fixando-as facilita muito o processo de fotografá-las, visto que, utilizando apenas o gelo como anestesia e mantendo-as vivas é praticamente impossível de realizar uma foto multifocal antes que elas despertassem e tornassem a se mover, borrando a foto.

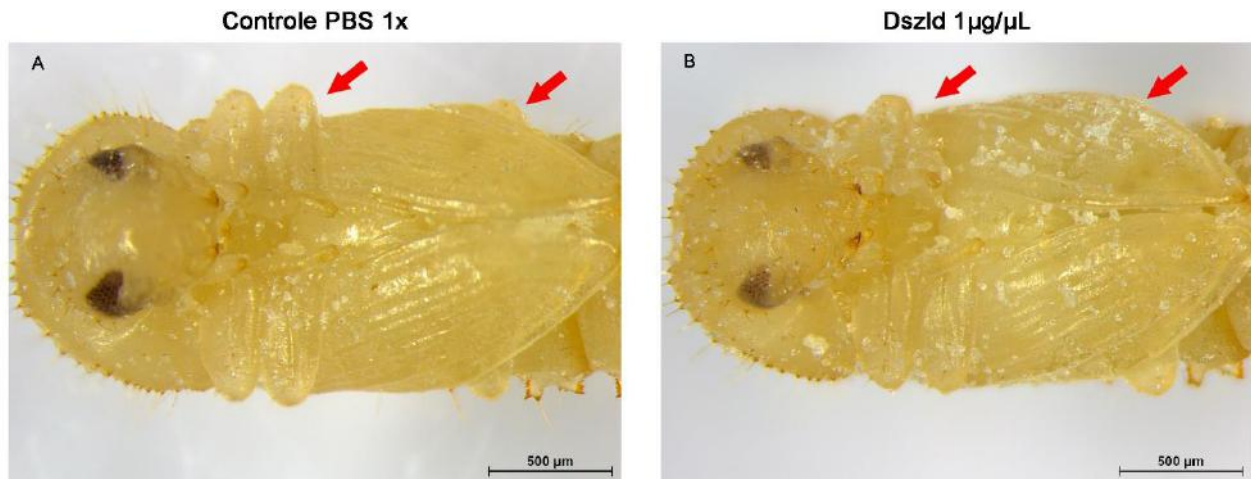
Ao atingir o estágio de pupa já é possível ter a certeza se as pernas irão ou não se regenerar no besouro adulto. Isso ocorre, porque a eficácia da regeneração nas larvas está ligada ao processo de mudas, e o estágio de pupa é um estágio tardio da metamorfose que não tem mais a capacidade regenerativa (LEE *et al.*, 2013). As pupas do grupo controle apresentaram claramente as estruturas das pernas visíveis (Figura 11A), que darão origem aos membros futuros no besouro (Figura 12A), enquanto no grupo do *dsz/d* não é possível visualiza-las (Figura 11B).

**Figura 10** - Larvas 10 dias após injeção, fixadas em PFA



**Legenda:** Quatro larvas, duas de cada grupo experimental, observadas na lupa em dois ângulos diferentes. Larvas injetadas com PBS 1x (A e B), (C e D). Larvas do injetadas com dsRNA *z/d* (E e F), (G e H). Setas vermelhas indicando o local da lesão, marcando assim a ausência ou presença da regeneração.

**Figura 11** - Pupas 14 dias após a injeção



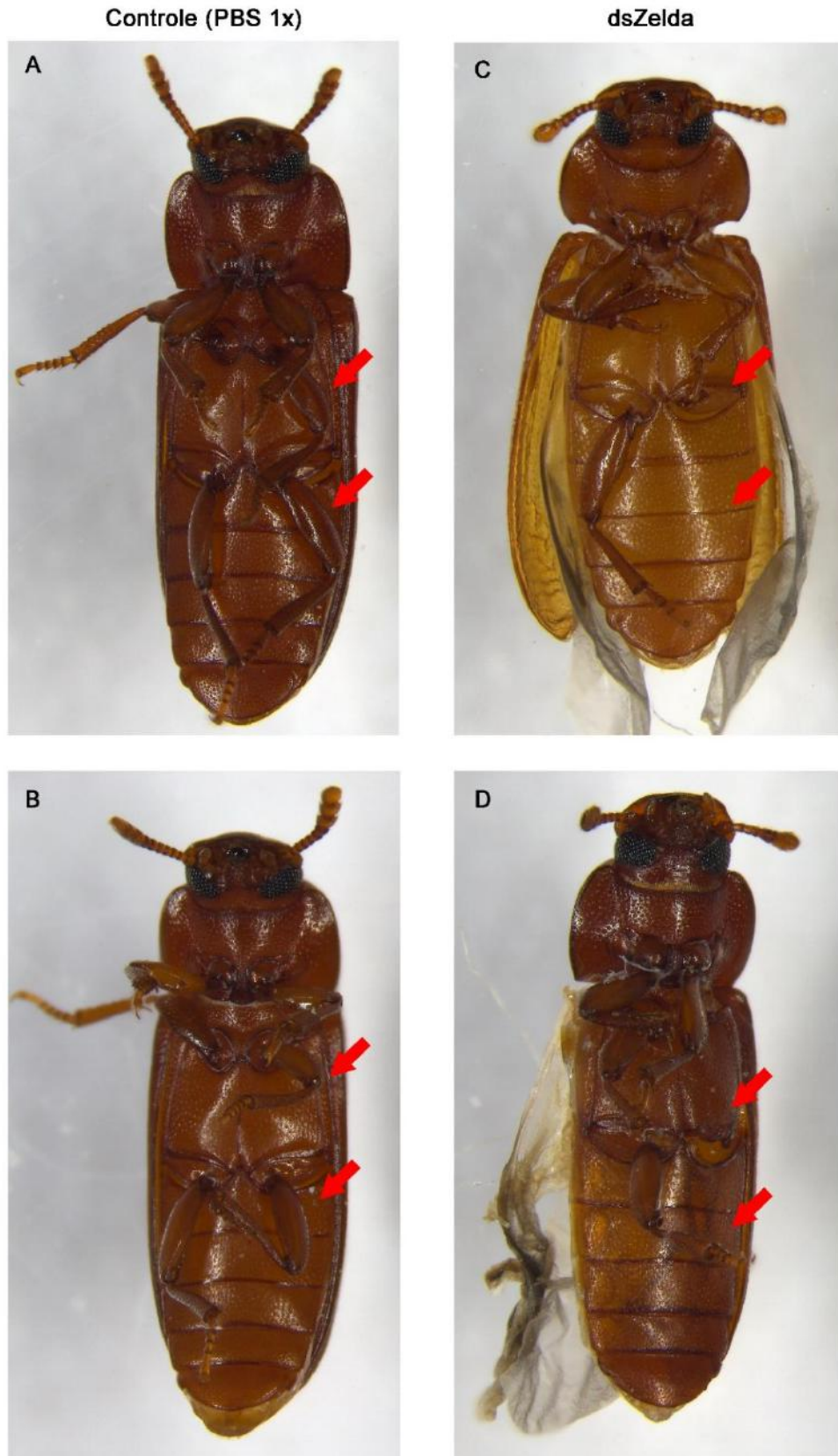
**Legenda:** Pupas 14 dias após a injeção, injetada com PBS 1x (A) e dsRNA *zld* (B). Setas vermelhas indicando a presença ou ausência das pernas no lado lesionado.

No estágio final da metamorfose com os besouros adultos, os animais foram fixados novamente em PFA 8% antes de realizar as fotos, visto que não havia mais necessidade de mantê-los vivos, pois foi atingindo o fim do processo de regeneração. Na fase adulta é possível visualizar de fato os indivíduos que regeneraram seus apêndices ou não, bem como a extensão dessa regeneração. Pode ser observado que os indivíduos do grupo controle obtiveram uma regeneração satisfatória dos membros (Figura 12A e 12B), enquanto os indivíduos silenciados para *zld* não. (Figura 12C e 12D).

Nos besouros também é possível confirmar que o silenciamento por meio de RNAi pela injeção do ds*zld* foi um sucesso, visto que os indivíduos gerados no grupo experimental apresentaram os fenótipos esperados do silenciamento desse FT como: problemas no desenvolvimento e fechamento da asa (Figura 13C) e fusão dos segmentos as antenas (Figura 13D) (RIBEIRO *et al.* 2017).



Figura 12 - Besouros 22 dias após injeção, fixados em PFA.



**Legenda:** Quatro besouros, dois injetados com PBS (A e B) e 2 injetados com dsRNA *zld* (C e D).  
Setas vermelhas indicando a presença ausência das pernas regeneradas.

**Figura 13** - Confirmação dos fenótipos esperados do silenciamento *zld*



**Legenda:** Besouros fixados em PFA 22 dias após a injeção, A e B injetados com PBS 1x, C e D injetados com *dszld*. Setas vermelhas sinalizando as alterações de fenotípicas causadas ou não pelo silenciamento.

## 5.2 CLASSIFICAÇÃO DOS HEMÓCITOS

Foram evidenciados 8 tipos de hemócitos diferentes circulantes na hemolinfa do *T.castaneum*, sendo estes: os adipohemócitos (Figura 14, Ad), que se mostraram células ovóides com tamanhos relativamente variáveis, diâmetro médio (DM) =  $5,7 \pm 1,8 \mu\text{m}$  (n=8), e a presença de pequenas inclusões lipídicas no citoplasma, com diâmetro médio de  $1,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$  (n=12). Os amebócitos (Figura 14, Am) que se caracterizaram como células de pequena dimensão, DM =  $4,3 \pm 0,45 \mu\text{m}$  (n=4), com baixa razão núcleo:citoplasma e que apresentaram pequenas projeções do citoplasma, lembrando pseudópodes. Já os plasmatócitos (Figura 14, Pl), constituíram células de tamanho médio, DM =  $8,49 \pm 0,62 \mu\text{m}$  (n=10), pleomórficas, que variavam de uma forma discoide a forma de fuso, contendo algumas granulações e alguns parecendo ser multinucleados. Os oenócitos (Figura 14, Oe) apresentaram um tamanho celular maior, DM =  $18,4 \pm 4,6 \mu\text{m}$  (n=8), com um citoplasma mais acidófilo, perfil circular, e um núcleo bem evidente e característico, dando a impressão que está sendo projetado da célula. Os granulócitos (Figura 14, Gr), que se caracterizaram pelo citoplasma repleto de grânulos acidófilos uniformes, dificultando até mesmo a visualização do núcleo. Os esferulócitos (Figura 14, Es) foram identificados como células também ovóides com marcantes inclusões esféricas acidófilas em seu citoplasma. Os pró-hemócitos (Figura 14, Pr), que foram descritos em outras espécies de insetos como os precursores dos outros hemócitos (LAWRENCE, 2008), foram as menores células encontradas, DM =  $2,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$  (n=5). Os pró-hemócitos são redondos, e têm uma alta razão núcleo:citoplasma com um núcleo basofílico. Por fim, foram encontradas células vacuolizadas ou Vacuolócitos (Vac) peculiares, que apresentaram um tamanho médio, DM =  $12,6 \pm 3,9 \mu\text{m}$  (n=10), um núcleo extremamente periférico bem característico e um citoplasma sem inclusões, com o que aparenta ser um grande vacúolo, como evidenciado na microscopia eletrônica (Figura 14, E Vac).

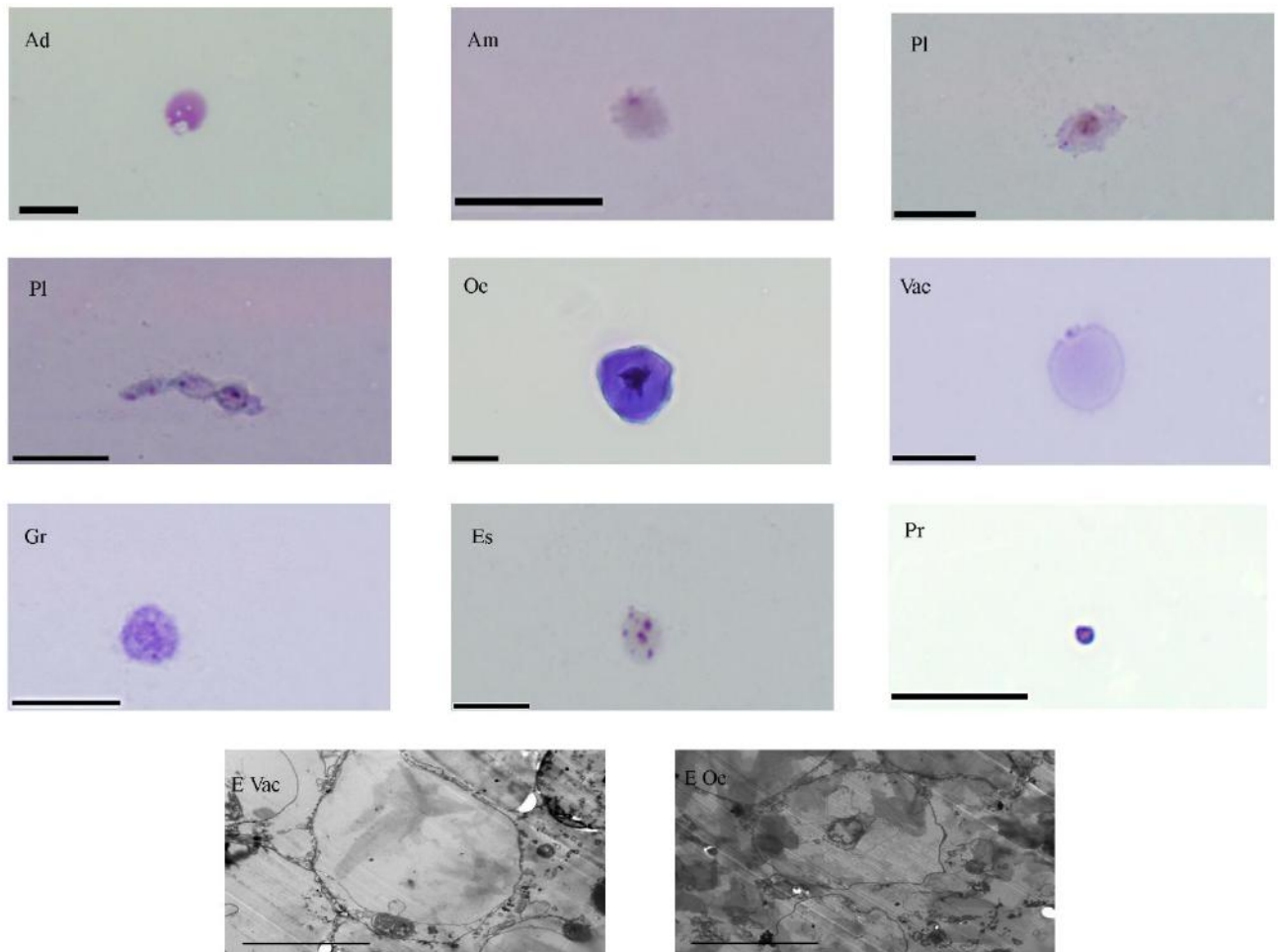
A classificação dos hemócitos de maneira clássica se dá principalmente pela caracterização morfológica das células observadas em microscopia óptica em comparação com as observações das ultraestruturas vistas na microscopia eletrônica. Nesse estudo foram identificados, na hemolinfa do *T.castaneum*, os tipos de hemócitos mais comuns dentre os insetos, sendo esses: adipohemócitos,

granulócitos, oenócitos, plasmatócitos, pró-hemócitos, e esferulócitos (LAWRENCE, 2008), esses tipos celulares foram evidenciados por estudos em outros animais também da ordem coleóptera como: *Carabus lefebvrei* Dejean 1826 (GIGLIO *et al.*, 2008), *Cetonischema aeruginosa* (GIULIANI *et al.*, 2003), *Tenebrio molitor* (VOMMARO *et al.*, 2021) *Allomyrina dichotoma* (HWANG *et al.*, 2015) e *Rhynchophorus ferrugineus* (MANACHINI *et al.*, 2011). As células descritas nesses estudos apresentam características morfológicas semelhantes às visualizadas nos tipos celulares encontrados no *T.castaneum*. Algumas células como os amebócitos e os vacuolócitos não foram descritos previamente nessa ordem, porém sua morfologia distinta nos levou a direcioná-los a uma tentativa de classificação. Células do tipo vacuolócitos foram identificadas em *Drosophila*, porém com vacúolos menores dos que os observados nas células do *T.castaneum* (LAWRENCE, 2008).

Um dos parâmetros mais importantes para a correta identificação dos hemócitos é a observação das ultraestruturas celulares através da microscopia eletrônica (BREHÉLIN e ZACHARY, 1986). Nesse estudo foi realizado uma tentativa de observar tais estruturas, porém na maioria das imagens obtidas, muita interferência foi observada por cima das células, atrapalhando o processo de identificação. Supõe-se que isso possa ter ocorrido devido a um corte com espessura acima do ideal para visualização na MET. Novos cortes com menor espessura chegaram a ser realizados, porém empecilhos na plataforma de utilização do MET na Fiocruz impediram a observação dos mesmos. Ainda assim, algumas células com estruturas semelhantes as visualizadas na microscopia óptica puderam ser observadas. (Figura 14, E Vac e E Oe.).



**Figura 14-** Hemócitos *T.castaneum*



**Legenda:** (Ad) Adipohemócito. (Am) Amebócito, (Pl) Plasmatócito, (Oe) Oenócito. (Gr) Granulócito. (Es) Esferulócito. (Pr) Pró-hemócito. (Vac) Vacuolócito. Eletromicrografias de transmissão do vacuolócito e Oenócito: (E Vac), (E Oe). Fotografias realizadas em microscópio ótico com aumentos de 40X a 100X. Barra sinaliza 10  $\mu$ m.

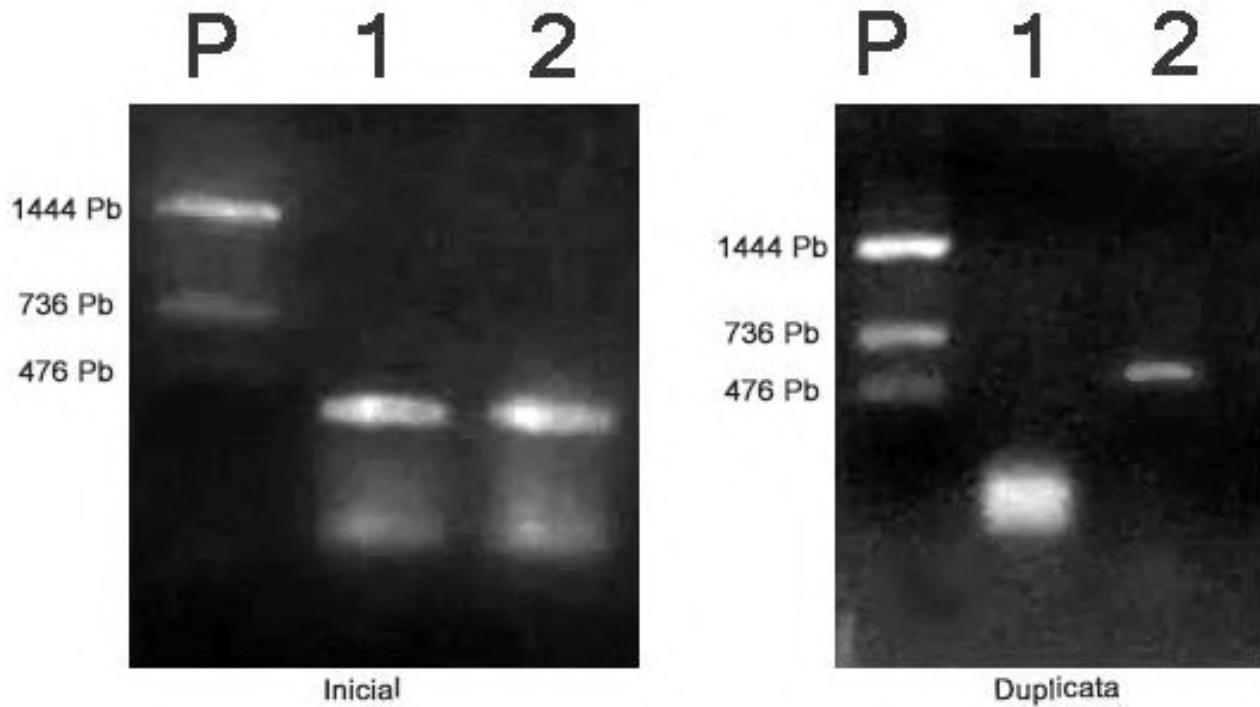
### 5.3 EXPRESSÃO DO *ZLD* NOS HEMÓCITOS

As células que formam o blastema constituem células com alta capacidade proliferativa que se encontram em um ambiente com diversos reguladores de expressão gênica locais, como: fatores de crescimento, fatores de transcrição e morfógenos, que são necessários para regeneração (SHEBESTA *et al.*, 2016); (YOSHINARI *et al.*, 2009). Devido as características dos hemócitos como migração para o local de lesão e sinalização celular, é de interesse investigar se a participação do gene *zld* na regeneração poderia estar relacionada com a expressão deste fator pelos hemócitos.

Em um primeiro experimento, foi utilizado como controle positivo de expressão, os embriões de *T. castaneum*, pois a expressão de *zld* é conhecida como positiva nestes (RIBEIRO *et al.*, 2017) e a amostra de hemolinfa para realizar o RT-PCR. Neste experimento foi observado que a expressão do gene *zld* nos hemócitos se deu positiva (Figura 15). A fim de corroborar esse resultado, novos ensaios de RT-PCR foram realizados. Na duplicata realizada o resultado curiosamente se demonstrou contrário do visualizado de início, sendo possível visualizar apenas uma banda mais abaixo e larga, que provavelmente caracteriza dímeros de primer, um subproduto da reação de PCR (Figura 15). Porém, ainda na duplicata a banda referente ao controle não aparenta estar na mesma altura da anterior visualizada pelo padrão de peso molecular, o que pode sinalizar alguma amplificação não específica.

Posteriormente então, o experimento foi repetido para tentar entender o que de fato estava ocorrendo. Nos experimentos subsequentes utilizamos dessa vez como corrida padrão as larvas de *T. castaneum*, investigando a expressão de *zld*, *cactus*, *hedgehog* e *rps3*, todos estes genes são normalmente expressos na larva de *T. castaneum*. Não há informação na literatura sobre os genes expressos pelos hemócitos do *T. castaneum*, sendo assim, escolhemos estes genes pois: O *cactus* desempenha uma função importante na hematopoiese e diferenciação dos hemócitos em *D. melanogaster*, funcionando como um possível controle positivo (QIU *et al.*, 1998), o gene *hedgehog* participa da segmentação embrionária funcionando como um possível controle negativo (FARZANA e BROWN, 2008) e o *rps3* como um controle positivo absoluto da síntese de cDNA e expressão por RT-PCR, visto que esse é um gene constitutivo ribossomal expresso em todas as células (LORD *et al.*, 2010).

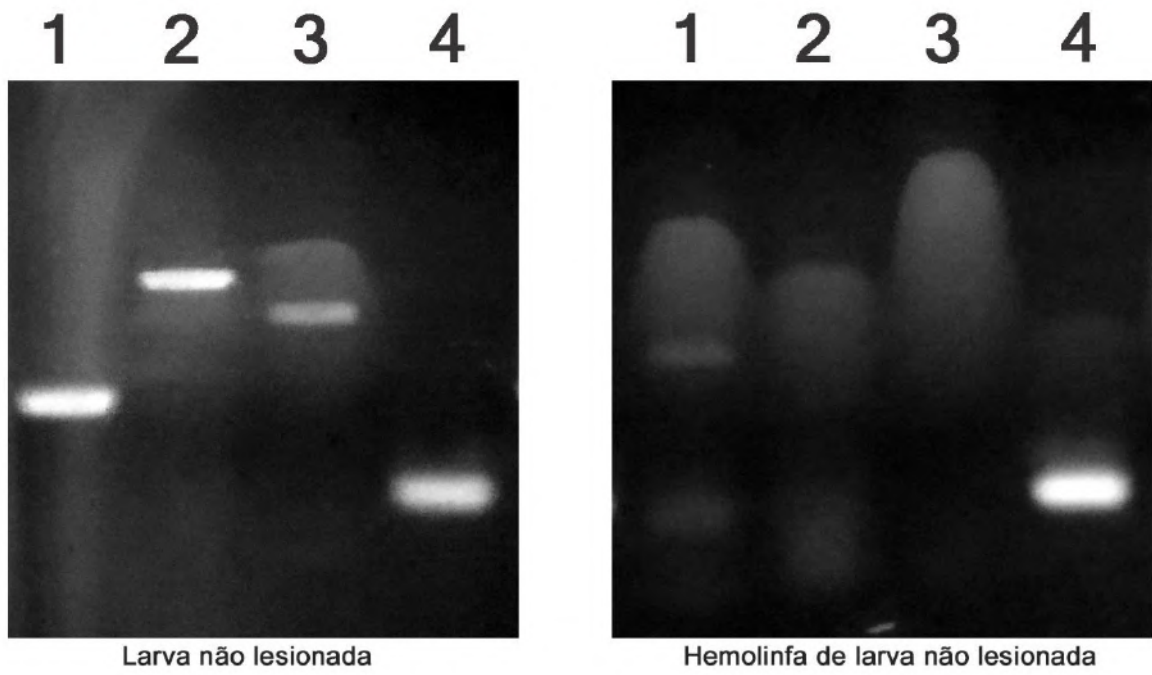
**Figura 15** - Gel de agarose do PCR *zld* hemócitos/embrião



**Legenda:** P: Padrão de peso molecular, Pb: Pares de base, 1: *zld* nos hemócitos, 2: *zld* em embriões.

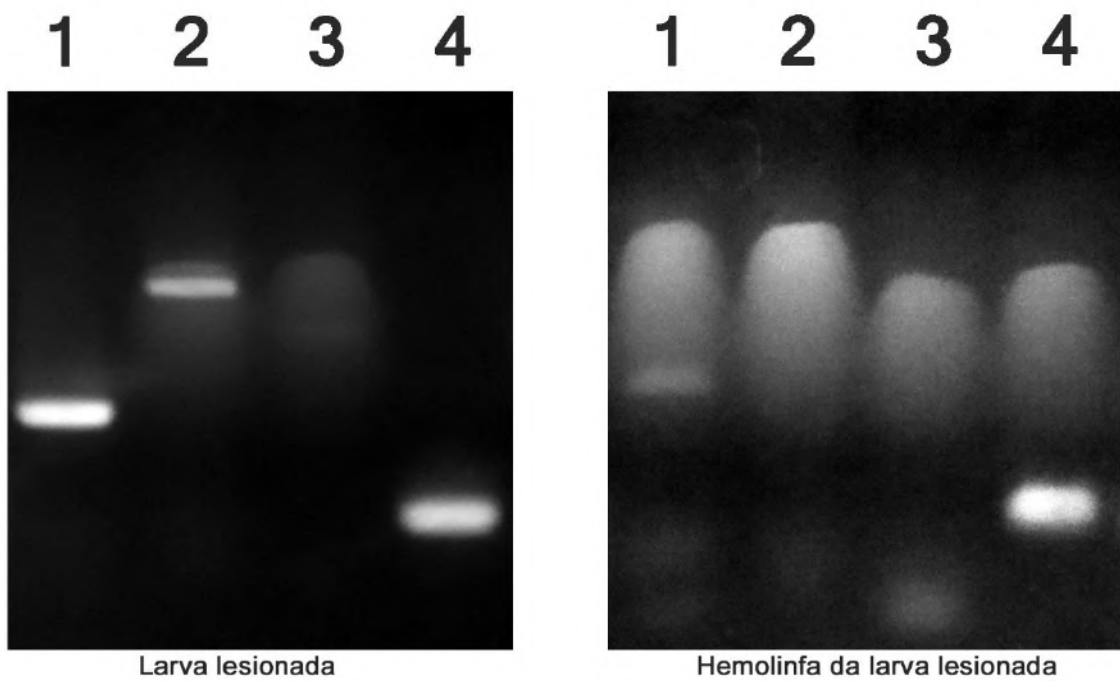
A fim de descartar a possibilidade de que a lesão nas larvas estaria causando alguma mudança na expressão dos genes de interesse nas células, foi utilizado dois grupos de amostras experimentais, sendo eles, larvas não lesionadas e sua hemolinfa, e larvas dois dias após a lesão conjuntamente com sua hemolinfa. No grupo utilizando as larvas não lesionadas a expressão dos genes seguiram como o esperado pela literatura, sendo possível visualizar a expressão do *zld*, *cactus*, *hedgehog* e *rps3*, enquanto que na sua amostra da hemolinfa foi possível identificar apenas a expressão do gene constitutivo *rps3* e um banda bem fraca do *zld* quase que insignificante quando comparada com o controle larval (Figura 16). Já no grupo onde fora utilizado as larvas após a lesão e sua hemolinfa pode-se observar curiosamente que nas larvas controle a presença da expressão do gene *hedgehog* não foi identificada. Porém é possível que esta diferença possa constituir um erro de técnica, visto que a literatura indica que a presença do *hedgehog* no *T. castaneum* é essencial para a regeneração dos apêndices das larvas (VILLAREAL *et al.*, 2015). Na amostra de hemolinfa extraída das larvas lesionadas novamente foi possível identificar a expressão do gene constitutivo *rps3* e uma fraca banda de expressão do *zld* (Figura 17).

**Figura 16** - Gel de agarose a partir de RT-PCR: Larvas não lesionadas e sua hemolinfa



**Legenda:** 1: *Zelda*, 2: *Cactus*, 3: *Hedgehog*, 4: *Rps3*

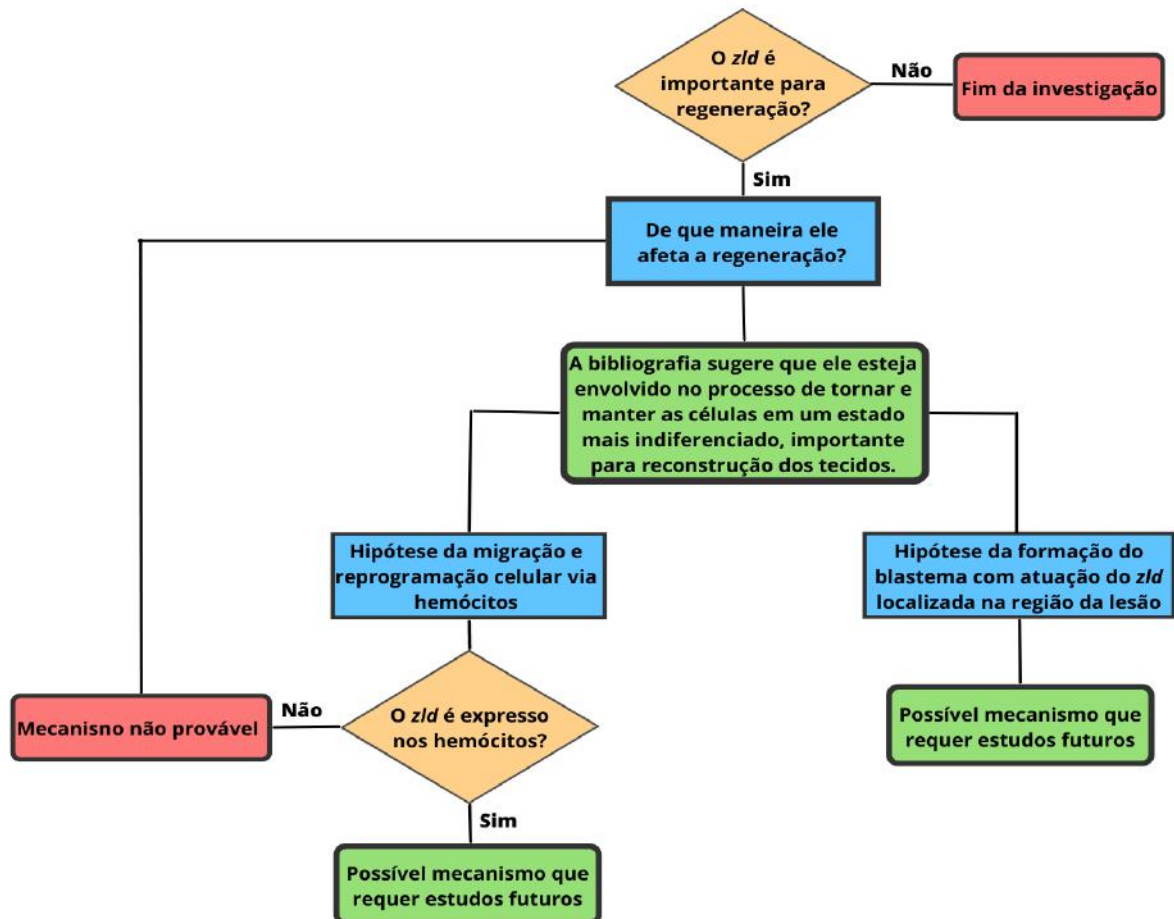
**Figura 17** - Gel de agarose a partir de RT-PCR: Larvas após lesão e sua hemolinfa



**Legenda:** 1: *Zelda*, 2: *Cactus*, 3: *Hedgehog*, 4: *Rps3*

Em conclusão, o *zld* não aparenta ser expresso diretamente nos hemócitos do *T.castaneum*, porém, estudos futuros são necessários para confirmar as informações observadas nos RT-PCRs, visto alguns problemas metodológicos e resultados inconclusivos. Caso seja confirmada a não expressão do *zld* nos HCTs, a hipótese de que o pode ter atuação mais específica e localizada apenas na área da lesão e na possível formação do blastema ganha mais força (Figura 18). Vimos que os HCTs desempenhem funções importantes regeneração em alguns insetos como atuação dos plasmaticos na regeneração das pernas do *Gryllus bimaculatus* (BANDO *et al.*, 2021). Porém, estudos em outros organismos como *D. melanogaster*, demonstram que os HCTs não são necessários para a regeneração das células do disco imaginal (KATSUYAMA e PARO, 2013), portanto, estudos futuros são necessários para avaliar a importância dos HCTs no processo regenerativo das pernas nas larvas de *T.castaneum*, contudo, os resultados do presente estudo sugerem que a atuação do *zld* nesse processo possa não envolvê-los diretamente.

**Figura 18** - Fluxograma dos possíveis mecanismos de ação do *zld* na regeneração



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1) A expressão do gene *zld* é essencial para o processo de regeneração dos apêndices no besouro *T. castaneum*.
- 2) Foram identificados 8 tipos celulares de hemócitos na hemolinfa da larva do besouro *T. castaneum*. Esta classificação é pioneira nessa espécie.
- 3) Não foi detectada a expressão do gene *zld* nos hemócitos das larvas de *T. castaneum*.

O projeto contribuiu para o aprendizado pessoal e o contato com técnicas de biologia molecular importantes a área farmacêutica atual, além de trazer informações relevantes para entendimento da regulação do processo regenerativo no *T. castaneum*. Tornam-se necessários estudos posteriores para corroborar algumas informações e elucidar de maneira clara o mecanismo por trás da atividade de *zld* para o processo de regeneração.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELINI, D. R.; SMITH, F. W.; JOCKUSCH, E. L. Extent With Modification: Leg Patterning in the Beetle *Tribolium castaneum* and the Evolution of Serial Homologs. **G3 (Bethesda)**, 2, n. 2, p. 235-248, Feb 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22384402/> Acessado em: maio de 2022.
- AUTER, A.; DEPLACE, A.; FREYTAG, D.; KERN, M. et al. [Pharmaceutical biotechnologies: drawing out the genome to develop, improve and personalize therapies and patient care]. **Biol Aujourd'hui**, 214, n. 3-4, p. 91-95, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33357366/> Acessado em: abril de 2022.
- BABCOCK DANIEL, T.; BROCK AMANDA, R.; FISH GREG, S.; WANG, Y. et al. Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105, n. 29, p. 10017-10022, 2008/07/22 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18632567/> Acessado em: abril de 2022.
- BANDO, T.; MITO, T.; HAMADA, Y.; ISHIMARU, Y. et al. Molecular mechanisms of limb regeneration: insights from regenerating legs of the cricket *Gryllus bimaculatus*. **The International Journal of Developmental Biology**, 62, n. 6-7-8, p. 559-569, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29938767/> Acessado em: abril de 2022.
- BANDO, T.; OKUMURA, M.; BANDO, Y.; HAGIWARA, M. et al. Toll signalling promotes blastema cell proliferation during cricket leg regeneration via insect macrophages. **Development**, 149, n. 8, p. dev199916, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34622924/> Acessado em: abril de 2022.
- BEIRA, J. V.; PARO, R. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. **Chromosoma**, 125, n. 4, p. 573-592, Sep 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27153833/> Acessado em: maio de 2022.
- BIDEAU, L.; KERNER, P.; HUI, J.; VERVOORT, M. et al. Animal regeneration in the era of transcriptomics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 78, 04/01 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-021-03760-7> Acessado em: dez. de 2021.
- BREHÉLIN, M.; ZACHARY, D., 1986, Berlin, Heidelberg. Insect Haemocytes: A New Classification to Rule Out the Controversy. **Springer Berlin Heidelberg**. 36-48. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-70768-1\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-70768-1_4) Acessado em: abril de 2022.
- BROCKES, J. P.; KUMAR, A. Comparative aspects of animal regeneration. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 24, p. 525-549, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18598212/> Acessado em: maio de 2022.
- DAMRAU, C.; TOSHIMA, N.; TANIMURA, T.; BREMBS, B. et al. Octopamine and Tyramine Contribute Separately to the Counter-Regulatory Response to Sugar Deficit

in *Drosophila*. **Frontiers in Systems Neuroscience** 11, 2018-January-15 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsys.2017.00100/full> Acessado em: abril de 2022.

DINSMORE C E (ed) 1992 A history of regeneration research: Milestones in the evolution of a science. **Cambridge University Press**. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=YI3Zx9mbhsC&lpg=PA47&pg=PP7#v=onepage&q&f=false> Acessado em: maio de 2022.

DE BARROS, C. M.; DE CARVALHO, D. R.; ANDRADE, L. R.; PAVÃO, M. S. et al. Nitric oxide production by hemocytes of the ascidian *Styela plicata*. **Cell Tissue**, 338, n. 1, p. 117-128, Oct 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19711101/> Acessado em: fev. de 2022.

FARZANA, L.; BROWN, S. J. Hedgehog signaling pathway function conserved in *Tribolium* segmentation. **Development Genes and Evolution**, 218, n. 3, p. 181-192, 2008/04/01 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18392879/> Acessado em: maio de 2022.

FRISTROM, D. K.; RICKOLL, W. L. The Morphogenesis of Imaginal Discs of *Drosophila*. In: KING, R. C. e AKAI, H. (Ed.). **Insect Ultrastructure: Volume 1**. Boston, MA: Springer US, 1982. p. 247-277. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-7266-4\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-7266-4_9) Acessado em: maio 2022.

FOX, D. T.; COHEN, E.; SMITH-BOLTON, R. Model systems for regeneration: *Drosophila*. **Development**, 147, n. 7, p. dev173781, 2020. Disponível em: <https://journals.biologists.com/dev/article/147/7/dev173781/223043/Model-systems-for-regeneration-Drosophila> Acessado em: abril de 2022.

GARCIA, M. F.; MOORE, C. D.; SCHULZ, K. N.; ALBERTO, O. et al. Structural Features of Transcription Factors Associating with Nucleosome Binding. **Molecular Cell**, 75, n. 5, p. 921-932.e926, 2019/09/05/ 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276519304423> Acessado em: abril de 2022.

GIANNIOS, P.; TSITILOU, S. G. The embryonic transcription factor Zelda of *Drosophila melanogaster* is also expressed in larvae and may regulate developmentally important genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 438, n. 2, p. 329-333, 2013/08/23/ 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X1301231X> Acessado em: abril de 2022.

GIGLIO, A.; BATTISTELLA, S.; TALARICO, F. F.; BRANDMAYR, T. Z. et al. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. **Micron**, 39, n. 5, p. 552-558, Jul 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17825571/> Acessado em: abril de 2022.



GIULIANINI, P. G.; BERTOLO, F.; BATTISTELLA, S.; AMIRANTE, G. A. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis. **Tissue Cell**, 35, n. 4, p. 243-251, Aug 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12921707/> Acessado em: abril de 2022.

GOTO, A.; KADOWAKI, T.; KITAGAWA, Y. Drosophila hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. **Developmental Biology**, 264, n. 2, p. 582-591, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160603004639> Acessado em: abril de 2022.

HWANG, S.; BANG, K.; LEE, J.; CHO, S. Circulating Hemocytes from Larvae of the Japanese Rhinoceros Beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the Cellular Immune Response to Microorganisms. **PLOS ONE**, 10, n. 6, p. e0128519, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128519> Acessado em: abril de 2022.

JOPLING, C.; BOUE, S.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 12, n. 2, p. 79-89, Feb 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3043> Acessado em: nov de 2021.

JOVEN, A.; ELEWA, A.; SIMON, A. Model systems for regeneration: salamanders. **Development**, 146, n. 14, p. dev167700, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31332037/> Acessado em: nov de 2021.

KARATHANASIS, S. K. Regenerative medicine: transforming the drug discovery and development paradigm. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 4, n. 8, p. a014084, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25085955/> Acessado em: abril de 2022.

KATSUYAMA, T.; PARO, R. Innate immune cells are dispensable for regenerative growth of imaginal discs. *Mechanisms of Development*, 130, n. 2, p. 112-121, 2013/02/01/ 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477312001165> Acessado em: maio de 2022.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0965174802000929?via%3Dihub> Acessado em: abril de 2022.

LARSON, E. D.; KOMORI, H.; GIBSON, T. J.; OSTGAARD, C. M. et al. Cell-type-specific chromatin occupancy by the pioneer factor Zelda drives key developmental transitions in *Drosophila*. *Nature Communications*, 12, n. 1, p. 7153, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27506-y> Acessado em: maio 2022.

- LAWRENCE, P. O. Hemocytes of Insects: Their Morphology and Function. In: CAPINERA, J. L. (Ed.). **Encyclopedia of Entomology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. p. 1787-1790. Disponível em: [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4020-6359-6\\_1302#:~:text=Hemocytes%20are%20blood%20cells%20that,organic%20molecules%20constitute%20the%20hemolymph](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4020-6359-6_1302#:~:text=Hemocytes%20are%20blood%20cells%20that,organic%20molecules%20constitute%20the%20hemolymph) Acessado em: abril 2022.
- LEE, A. K.; SZE, C. C.; KIM, E. R.; SUZUKI, Y. Developmental coupling of larval and adult stages in a complex life cycle: insights from limb regeneration in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. **EvoDevo**, 4, n. 1, p. 20, 2013/07/04 2013. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23826799/> Acessado em: nov. 2021.
- LEE, S. W. L.; PAOLETTI, C.; CAMPISI, M.; OSAKI, T. et al. MicroRNA delivery through nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, 313, p. 80-95, Nov 10 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6900258/> Acessado em: abril de 2022.
- LIANG, H.-L.; NIEN, C.-Y.; LIU, H.-Y.; METZSTEIN, M. M. et al. The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. **Nature**, 456, n. 7220, p. 400-403, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature07388> Acessado em: abril de 2022.
- LORD, J. C.; HARTZER, K.; TOUTGES, M.; OPPERT, B. Evaluation of quantitative PCR reference genes for gene expression studies in *Tribolium castaneum* after fungal challenge. **Journal of Microbiologic Methods**, 80, n. 2, p. 219-221, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20026205/> Acessado em: maio de 2022.
- MANACHINI, B.; ARIZZA, V.; PARRINELLO, D.; PARRINELLO, N. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 106, n. 3, p. 360-365, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21147119/> Acessado em: dez de 2021.
- MARSH, J. L.; THEISEN, H. Regeneration in insects. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 10, n. 4, p. 365-375, 1999/08/01/ 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1084952199903233> Acessado em: abril de 2022.
- MUNEOKA, K.; ALLAN, C. H.; YANG, X.; LEE, J. et al. Mammalian regeneration and regenerative medicine. **Birth Defects Resesearch**, 84, n. 4, p. 265-280, Dec 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19067422/> Acessado em: abril de 2022.
- MUNEOKA K. ; SASSOON D. Molecular aspects of regeneration in developing vertebrate limbs. **Developmental Biology**. 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1628757/> Acessado em: Abril de 2022
- NAKAMURA, T.; MITO, T.; BANDO, T.; OHUCHI, H. et al. Dissecting insect leg regeneration through RNA interference. **Cellular and molecular life sciences:**

**CMLS**, 65, p. 64-72, 02/01 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18030418/> Acessado em: abril 2022.

NIWA, N.; INOUE, Y.; NOZAWA, A.; SAITO, M. et al. Correlation of diversity of leg morphology in *Gryllus bimaculatus* (cricket) with divergence in dpp expression pattern during leg development. **Development**, 127, n. 20, p. 4373-4381, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11003837/> Acessado em: maio 2022.

NOWICK, K.; STUBBS, L. Lineage-specific transcription factors and the evolution of gene regulatory networks. **Briefings in Functional Genomics**, 9, n. 1, p. 65-78, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081217/> Acessado em: dez. 2021.

OKADA, T. S. A brief history of regeneration research for admiring Professor Niazi's discovery of the effect of vitamin A on regeneration. **Journal of Biosciences**, 21, p. 261-271, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02703088> Acessado em: maio 2022.

PASTOR-PAREJA, J. C.; WU, M.; XU, T. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. **Disease Models & Mechanisms**, 1, n. 2-3, p. 144-154, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19048077/> Acessado em: maio 2022.

PETER W. REDDIEN. The Cellular and Molecular Basis for Planarian Regeneration, **Cell**, Volume 175, Issue 2, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867418312339> Acessado em: Abril de 2022.

QIU, P.; PAN, P. C.; GOVIND, S. A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. **Development**, 125, n. 10, p. 1909-1920, 1998. Disponível em: <https://journals.biologists.com/dev/article/125/10/1909/39804/A-role-for-the-Drosophila-Toll-Cactus-pathway-in> Acessado em: maio 2022.

REPISO, A.; BERGANTIÑOS, C.; COROMINAS, M.; SERRAS, F. Tissue repair and regeneration in *Drosophila* imaginal discs. **Development, Growth & Differentiation**, 53, n. 2, p. 177-185, 2011/02/01 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21338344/> Acessado em: março 2022.

REDDY PC, GUNGI A, UNNI M. Cellular and Molecular Mechanisms of Hydra Regeneration. Results Probl **Cell Differentiation**. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31598861/#:~:text=Hydra%20is%20one%20of%20the,understanding%20the%20process%20of%20regeneration.> Acessado em maio 2022.

RIBEIRO, L.; TOBIAS-SANTOS, V.; SANTOS, D.; ANTUNES, F. et al. Evolution and multiple roles of the Pancrustacea specific transcription factor *Zelda* in insects. **PLOS Genetics**, 13, n. 7, p. e1006868, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1006868> Acessado em: nov 2021.

- RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; WEINSTOCK, G. M.; BROWN, S. J. et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, 452, n. 7190, p. 949-955, Apr 24 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature06784> Acessado em: maio 2022.
- SCHEBESTA, M.; LIEN, C.-L.; ENGEL, F. B.; KEATING, M. T. Transcriptional profiling of caudal fin regeneration in zebrafish. **The Scientific World Journal**, p. 38-54, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5917411/> Acessado em: maio 2022.
- SCHRÖDER, R.; BEERMANN, A.; WITTKOPP, N.; LUTZ, R. From development to biodiversity-Tribolium castaneum, an insect model organism for short germband development. **Development Genes and Evolution**, 218, n. 3-4, p. 119-126, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00427-008-0214-3> Acessado em: maio 2022.
- SCHULZ, K. N.; BONDRA, E. R.; MOSHE, A.; VILLALTA, J. E. et al. Zelda is differentially required for chromatin accessibility, transcription factor binding, and gene expression in the early Drosophila embryo. **Genome Research**, 25, n. 11, p. 1715-1726, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26335634/> Acessado em: abril 2022.
- SHAH, M. V.; NAMIGAI, E. K. O.; SUZUKI, Y. The role of canonical Wnt signaling in leg regeneration and metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Mechanisms of Development**, 128, n. 7, p. 342-358, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477311000888> Acessado em: abril 2022.
- SILVA, J. E.; BOLELI, I. C.; SIMÕES, Z. L. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. **Braz Journal of Biology**, 62, n. 4a, p. 689-699, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12659019/> Acessado em: abril 2022.
- SLACK, J. M. Amphibian muscle regeneration--dedifferentiation or satellite cells? **Trends Cell Biol**, 16, n. 6, p. 273-275, Jun 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16697200/> Acessado em: maio 2022.
- STEWART, S.; STANKUNAS, K. Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. **Development Biology**, 365, n. 2, p. 339-349, May 15 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22426105/> Acessado em: maio 2022.
- STRAND, M. R.; PECH, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annu Rev Entomol**, 40, p. 31-56, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7810989/> Acessado em: março 2022.
- SUN, Y.; NIEN, C. Y.; CHEN, K.; LIU, H. Y. et al. Zelda overcomes the high intrinsic nucleosome barrier at enhancers during *Drosophila* zygotic genome activation.

**Genome Res**, 25, n. 11, p. 1703-1714, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26335633/> Acessado em: março 2022.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, 126, n. 4, p. 663-676, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16904174/> Acessado em: maio 2022.

TANAKA, E. M.; REDDIEN, P. W. The cellular basis for animal regeneration. **Developmental cell**, 21, n. 1, p. 172-185, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21763617/> Acessado em: maio 2022.

TOMOYASU, Y.; DENELL, R. E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Development Genes and Evolution**, 214, n. 11, p. 575-578, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15365833/> Acessado em: maio 2022.

TREMBLEY, A.; PRONK, C.; SCHLEY, J. v. d.; LYONET, P. Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce, à bras en forme de cornes. **A Leide :: Chez Jean & Herman Verbeek**, 1744. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/130183#page/27/mode/1up> Acessado em: nov 2021.

TSONIS, P. A.; FOX, T. P. Regeneration according to Spallanzani. **Dev Dyn**, 238, n. 9, p. 2357-2363, Sep 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19653326/> Acessado em: nov 2021.

VARGA, V. B.; SZIKSZAI, F.; SZINYÁKOVICS, J.; MANZÉGER, A. et al. Role of hemocytes in the regeneration of germline stem cells in *Drosophila*, **bioRxiv**, 2020. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.31.275255v1.full> Acessado em: maio 2022.

VILLARREAL, C. M.; DARAKANANDA, K.; WANG, V. R.; JAYAPRAKASH, P. M. et al. Hedgehog signaling regulates imaginal cell differentiation in a basally branching holometabolous insect. **Developmental Biology**, 404, n. 2, p. 125-135, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160615300026> Acessado em: maio 2022.

VOMMARO ML, KURTZ J, GIGLIO A. Morphological Characterisation of Haemocytes in the Mealworm Beetle *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). **Insects**. 2021 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34066849/> Acessado em: Abril 2022

WEISSMAN, I. L.; ANDERSON, D. J.; GAGE, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 17, p. 387-403, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687494/> Acessado em: dez 2021.

WERNER, M.; RUFFIN, M.; WEST, E. Regenerative medicine: A paradigm shift in healthcare. 12, p. 33-38, 2011. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/292916390\\_Regenerative\\_medicine\\_A\\_paradigm\\_shift\\_in\\_healthcare](https://www.researchgate.net/publication/292916390_Regenerative_medicine_A_paradigm_shift_in_healthcare) Acessado em: abril 2022.

YI, P. S.; ZHANG, M.; XU, M. Q. Role of microRNA in liver regeneration. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, 15, n. 2, p. 141-146, Apr 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1499387215600364?via%3Dihub> Acessado em: maio 2022.

YOSHINARI, N.; ISHIDA, T.; KUDO, A.; KAWAKAMI, A. Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. **Dev Biol**, 325, n. 1, p. 71-81, Jan 1 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18950614/> Acessado em: maio 2022.