

CAPÍTULO 2

Aspectos Morfofuncionais da Embriologia dos Artrópodes.

Rodrigo Nunes da Fonseca^{1,2}, Helga Gomes¹, Helena Araújo^{1,3}

¹Laboratório Integrado de Bioquímica Hatisaburo Masuda (LIBHM), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Campus Macaé.

² Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular.

³ Laboratório de Biologia Molecular do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Copyright: © 2012 [Rodrigo Nunes da Fonseca, Helga Gomes, Helena Araújo]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações Iniciais.

Um dos mais importantes aspectos fisiológicos dos artrópodes é a embriogênese. Ela compreende todos os estágios a partir da fecundação até a eclosão da larva ou indivíduo adulto. Nos últimos anos, estudos de biologia do desenvolvimento têm ajudado a compreender o processo de embriogênese a nível molecular e celular em várias espécies de artrópodes, estendendo o vasto conhecimento do organismo-modelo, a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, para os artrópodes vetores de doenças tropicais. Durante este capítulo abordaremos várias questões importantes da embriogênese tais como a formação dos eixos embrionários e sua relação com a ovogênese, as divisões iniciais (clivagens), a formação das membranas extra-embrionárias, a gastrulação e a organogênese. Esperamos com o presente capítulo divulgar e estimular as pesquisas na área sobre o controle molecular da embriogênese em insetos vetores.

Introdução.

Insetos pertencem ao mais numeroso Filo do Reino Animal, o Filo Arthropoda, cujo número de espécies é estimado em 5 milhões (Grimaldi e Engel, 2005). Toda essa diversidade biológica é importante para a ocupação de diversos nichos ecológicos com uma imensa variedade de formas. Dentre as fases de vida dos insetos a fase embrionária é das mais importantes para qualquer ação de controle populacional uma vez que o ovo não consegue se dispersar (Monnerat e cols., 2002). Acredita-se que durante a ocupação do nicho terrestre várias modificações na estrutura dos ovos de artrópodes ocorreram, tornando-os resistentes a variações ambientais (Roth, 2004). Neste capítulo discutiremos também a embriogênese de carrapatos, quelicerados artrópodes vetores de várias doenças de interesse médico.

Ovos de artrópodes podem ser tanto bilateralmente simétricos quando colocados tendo um eixo ântero-posterior e dorso-ventral evidente, ou serem esféricos quando expostos ao meio ambiente (Figura 1). Exemplos dessas formas são, respectivamente, os ovos do vetor mosquito da dengue, em formato de banana e ovos de espécies de aranhas e carrapatos, que possuem formas arredondadas. Assim, durante esse capítulo buscaremos descrever as principais características presentes em ovos de artrópodes, comparando o conhecimento presente nos insetos-modelo não-vetores com a embriogênese de artrópodes vetores.

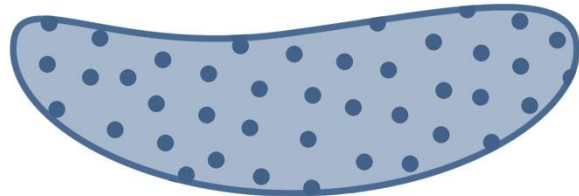
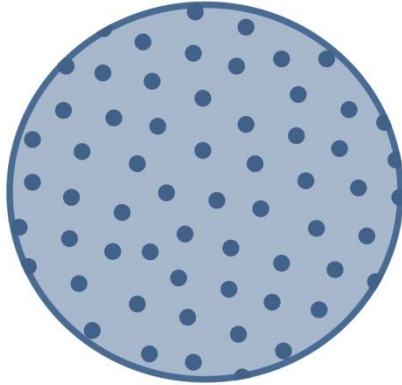
Carrapato - *B. microplus*

Mosquito - *A. aegypti*

Aranha - *A. tepidariorum*

Mosca - *D. melanogaster*

Barbeiro - *R. prolixus*



3

Figura 1: Ovos de artrópodes. Os ovos podem ser esféricos (aranha e carrapato, por exemplo) sem um claro eixo ântero-posterior (AP) e em forma de banana (moscas, mosquitos e barbeiros, por exemplo) com um eixo AP evidente. As espécies destacadas são utilizadas durante o texto. Ilustração por Vitória Santos.

Evolução da Ovogênese em Artrópodes e sua Relação com a Formação dos Eixos Embrionários.

A forma dos ovos de artrópodes é determinada durante o processo de ovogênese. Durante esse período a sua produção e maturação dos ovos ocorre a partir da proliferação e diferenciação das células-tronco primordiais nas fêmeas. Dois tipos básicos de ovogênese existem em insetos, o tipo panoístico e o tipo meroístico, sendo a principal diferença a presença de células nutridoras no último e a ausência no primeiro. Em geral, artrópodes pertencentes aos grupos mais basais possuem ovogênese do tipo panoística, enquanto que as ordens mais derivadas possuem ovogênese do tipo meroística (Figura 2).

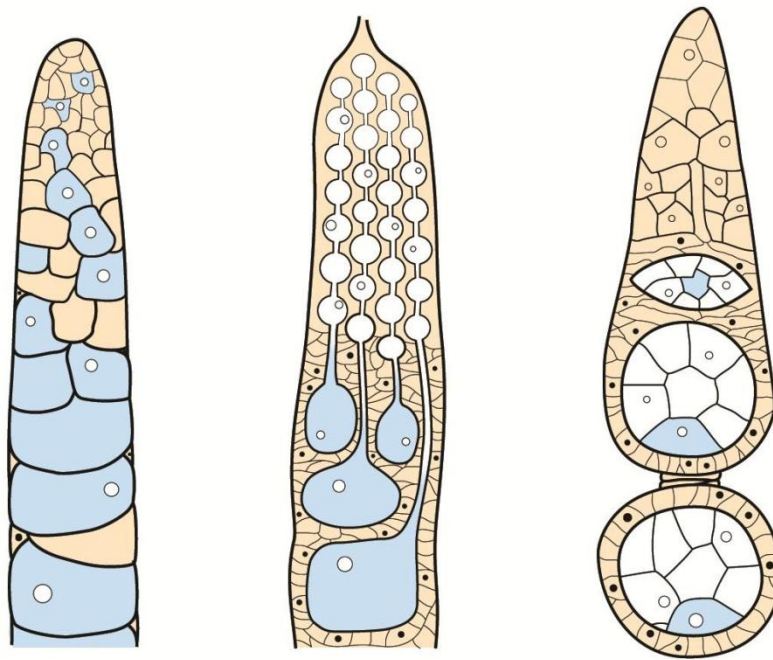


Figura 2: Tipos de ovários em insetos. (A) Ovário tipo panoístico onde o ovócito é azul e as laranjas são células foliculares. Não existem células nutridoras. (B) Ovário do tipo meroístico telotrófico onde células nutridoras permanecem no germário. (C) No ovário meroístico politrófico, encontrado por exemplo na mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, as células nutridoras poliplóides (branco) participam de cada cisto germinal e seguem o ovócito em azul até a sua liberação. Adaptado a partir de Buning, 1994. Ilustração por Vitória Santos.

Nos ovários de insetos o número de ovaríolos pode variar de 1 a mais de 1000 em uma única fêmea (Diptera como *Drosophila* ~10-30, *Calliphora* ~100), algumas abelhas têm mais de 2000 ovaríolos; enquanto alguns afídeos podem possuir somente um ovaríolo funcional (Chapman, 1998). Uma característica restrita aos insetos é o processo de maturação dos ovos, que acontece temporalmente no abdômen da mãe. Assim, ovos imaturos estão localizados na região mais proximal do abdômen e ovos maduros na região mais distal. O processo de ovogênese é largamente conhecido no principal inseto-modelo, a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, que possui um ovário meroístico politrófico (Lynch e Roth, 2011; Roth e Lynch, 2009). Nestes ovários não só células nutridoras existem, mas estas últimas acompanham o ovócito ao longo de todo seu processo de crescimento e maturação. Durante os estágios iniciais de ovogênese, no estágio de 16 células uma é selecionada para ser o ovócito enquanto que as 15 demais tornam-se células nutridoras. Essas células nutridoras tornam-se poliplóides e especializam em transcrever RNAs mensageiros importantes para o futuro desenvolvimento embrionário. Durante todo este processo de crescimento, células somáticas da mãe, as células

foliculares, envolvem cada folículo em insetos (Figura 2). A presença de ovaríolos é característica típica e exclusiva dos insetos, enquanto que artrópodes pertencentes a grupos basais tais como o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* apresentam um tubo contendo uma parede epitelial e os diversos estágios de ovogênese são observados, todavia ovaríolos não são observados (Figura 2, Saito e cols., 2005; Santos e cols., 2004). Neste modo de ovogênese todas as demais células darão origem a ovogônias que se diferenciarão em ovócitos. Este tipo de organização em que os ovários são desprovidos de células nutridoras caracteriza o tipo panoístico de ovogênese.

Em artrópodes o desenvolvimento do embrião depende de forma variada de fatores gerados pela mãe durante a ovogênese (fatores maternos) e mesmo de processos que ocorrem durante o desenvolvimento ovariano. Os mecanismos moleculares por trás desta regulação foram bem caracterizados no inseto modelo *Drosophila melanogaster*. O ovário de *Drosophila* consiste de cerca de 15-20 ovaríolos - arranjo linear de ovos em desenvolvimento que se geram a partir da região mais anterior chamada germário (Bastock e St Johnston, 2008). O germário possui de duas a três células germinativas primordiais (CGPs), das quais a linhagem se origina. As CGPs são mantidas por sinais produzidos por células somáticas, estes sinais que mantêm, assim, o nicho de células-tronco do ovário. A sinalização através da Bone Morphogenetic Protein (BMP) codificada por *decapentaplegic (dpp)* é fundamental para manter o caráter de auto-renovação destas células-tronco (Harris e Ashe, 2011; Harris e cols., 2011). Dpp, gerado pelas células somáticas do germário, funciona como um sinal de curto alcance para manter as CGPs adjacentes. Assim, quando uma CGP divide, uma célula-filha recebe o sinal de Dpp e não se diferencia enquanto que a outra, mais distante do sinal de Dpp, torna-se um citoblasto e move-se posteriormente. Longe deste sinal, o gene *Bam* é expresso causando a diferenciação das células germinativas. Em *Drosophila* a perda do sinal de Dpp permite que CGPs se diferenciem completamente enquanto que a expressão ectópica leva a uma expansão tumoral das CGPs (Harris e Ashe, 2011; Harris e cols., 2011).

Cada folículo ovariano é constituído de 16 células germinativas conectadas por canais em anel, todas originadas de uma mesma CGP (Figura 3, revisto em Roth e Lynch, 2009). Duas dessas células adquirem quatro canais de comunicação e são denominadas de pró-ovócitos, e por competição somente uma terminará a meiose I e será o futuro ovócito (Figura 3 em vermelho). As demais 15 células se tornarão nutridoras poliploídes. Essas células nutridoras transportarão RNAsm, proteínas e estruturas endomembranares (RER e Golgi) via os canais em anel. As divisões iniciais das CGPs acontecem até o momento em que 16 células são geradas. Nesse estágio de 16 células, o chamado cisto germinal é envolvido por células somáticas denominadas foliculares, sendo estas últimas essenciais para a formação do córion e padronização do ovo.

Ovário meroístico - células germinativas primordiais
dão origem ao complexo célula nutridora e ovócitos

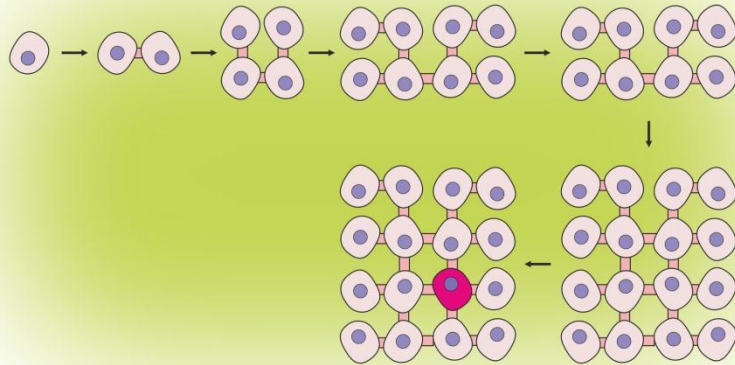


Figura 3: A célula germinativa primordial se divide e forma canais de comunicação com células adjacentes. Das 16 células haplóides formadas apenas uma contendo quatro canais será o ovócito e as quinze demais darão origem as células nutridoras poliplóides que se especializam em sintetizar substâncias (RER, RNAsm) para o ovócito.

Em *Drosophila melanogaster* cada ovariolo contém de seis a sete câmaras ovocitárias (ou folículos ovarianos) em fases distintas de desenvolvimento, conectados por células somáticas conectoras (“stalk cells”). Quatorze estágios morfológicamente distintos foram definidos para a ovogênese em *D. melanogaster*: os estágios 1 a 6 são chamados de iniciais, estágios de 7 a 10 de intermediário e de 11 a 14 como tardios (Bastock e St Johnston, 2008). Desta forma, o ovariolo é uma estrutura tubular com um eixo longo composto de várias câmaras ovocitárias conectadas entre si e um eixo curto (Figura 2, por exemplo). Estes dois eixos, longo e curto, correspondem respectivamente ao eixos antero-posterior (AP) e dorso-ventral (DV) do folículo ovariano e do futuro embrião.

Durante o processo de crescimento das câmaras ovocitárias, um grande aumento do volume do ovócito é observado e desenvolvem-se dois eventos fundamentais para a padronização dos eixos embrionários. Primeiro, a região posterior do ovócito se torna diferente das demais através de interações com as células foliculares posteriores e uma repolarização na estrutura da rede de microtúbulos do ovócito. Essa repolarização dos microtúbulos é fundamental para o transporte de dois RNAs mensageiros, *bicoid* e *oskar*, fundamentais para a determinação das regiões anteriores e posteriores, respectivamente (revisto em Roth e Lynch, 2009). A localização anterior do RNAm de *bicoid* é importante para a formação da futura cabeça e tórax e a posterior do RNAm de *oskar* é necessária para o abdomen. O segundo evento importante durante a fase intermediária da ovogênese é a migração do núcleo ao longo da região cortical, movendo-se de uma região posterior para o dorso-anterior do folículo. Esta migração define a região em que o RNAm do ligante de EGF (*epidermal growth factor*) denominado *gurken* será localizado, quebrando assim a simetria

dorsoventral do ovócito e do futuro embrião. A localização de *gurken* é apenas transiente e atua indiretamente através de um processo de sinalização nas células foliculares. Estas últimas determinam o eixo DV do embrião e a formação dos apêndices dorsais, estruturas do córion do embrião de *D. melanogaster*.

Nos estágios finais da ovogênese tanto as células foliculares quanto as nutridoras sofrem um processo de apoptose e no momento da postura os ovos contém apenas um único núcleo haplóide e as camadas externas tais como a membrana vitelínica e o córion este último que varia bastante em composição dependendo do local de ovoposição. A fertilização acontece no momento da passagem do ovo pelo tubo ovariano quando espermatozoides são liberados a partir da espermateca, numa região especializada denominada micrópila, que pode conter um ou mais orifícios pelo qual o espermatozoide penetra.

Diferente de outros animais, nos insetos o processo de fertilização não tem relação com a formação de eixos embrionários ou com a ativação do ovócito. A ativação do ovo depende da sinalização de cálcio e o ovo é ativado ao passar pelo trato reprodutivo em *D. melanogaster*, um evento que é provavelmente conservado em outros insetos. Em geral insetos são ovíparos, isto é, colocam ovo logo após a fertilização, embora existam vários exemplos de insetos vivíparos. A partir da fertilização, a segunda divisão meiótica termina e no início da embriogênese ocorre a fusão do pró-núcleo feminino com o pró-núcleo masculino.

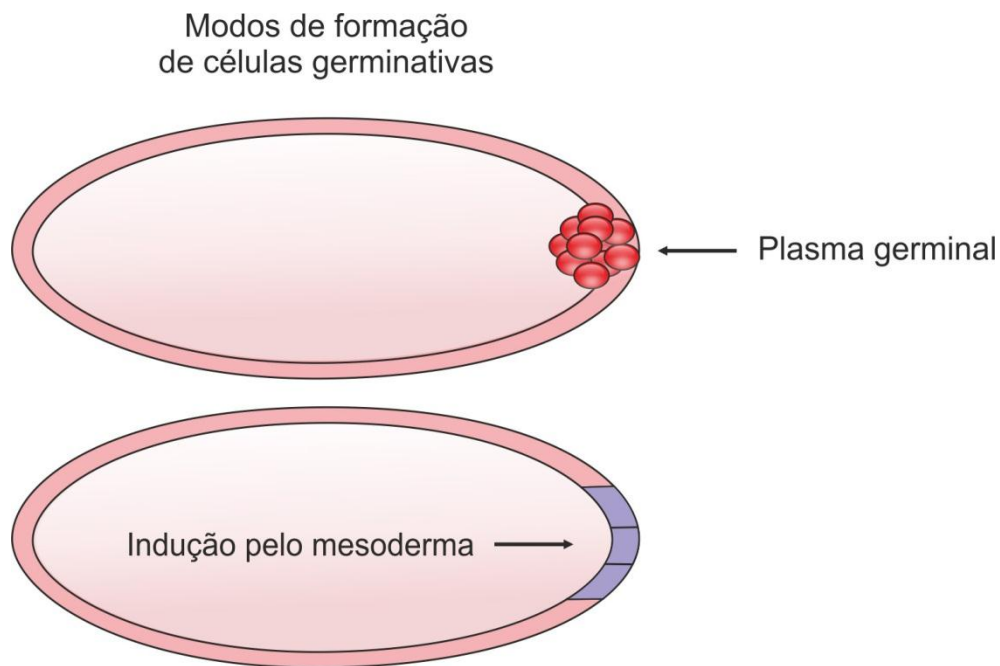


Figura 4: Modos de determinação das células germinativas em insetos. O primeiro por deposição do plasma germinal que ocorre durante a ovogênese, e o segundo com indução a partir do mesoderma.

Momentos Iniciais da Embriogênese - Clivagens e Formação do Blastoderma

A maior parte das espécies de artrópodes pertencentes a grupos antigos em nosso planeta (quelicerados, por exemplo) possuem grande quantidade de vitelo que é acumulado durante a ovogênese e uma embriogênese em geral bastante lenta. Nestes artrópodes, após o período embrionário, a ninfa que emerge do interior do ovo é bastante similar ao artrópode adulto. Por outro lado, insetos de ordens mais recentes como os holometábolos, que tem fases intermediárias de larva e pupa bem diferentes do adulto, possuem ovos em geral de menor tamanho e uma embriogênese mais rápida (Davis e Patel, 2002a). Uma tendência geral é que insetos que possuem ovogênese panoística, isto é, sem células nutridoras, possuam uma embriogênese mais lenta. Uma forma bastante utilizada para acelerar este processo é a formação inicial de um sincício, onde núcleos (energídeos) se dividem dentro de um citoplasma comum sem a formação de membranas plasmáticas entre as células. Estudos da primeira e segunda metade do século XX sugeriram que, em artrópodes basais, a formação de membranas plasmáticas e o isolamento das células aconteceria bem precocemente durante o desenvolvimento embrionário (revisto em Sander, 1976). Todavia, evidência direta de que existe um isolamento das membranas plasmáticas advém somente de estudos experimentais em que moléculas traçadoras são injetadas em diferentes momentos da embriogênese e se observa posteriormente se estas moléculas difundiram através das membranas celulares. Poucos estudos foram realizados nos últimos anos visando responder essa questão. Assim, foi determinado que na aranha *Achaeearanea tepidariorum* a celularização, aparecimento de membranas celulares, acontece logo no início da embriogênese antes do estágio de 16 células (Kanayama e cols., 2010). Por outro lado, outros autores sugerem que em embriões de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a celularização aconteceria bem mais tardiamente (Campos e cols., 2006) conforme previamente demonstrado para insetos holometábolos (Campos-Ortega e Hartenstein, 1985). Resultados preliminares recentes (Santos VT e Fonseca RN, submetido para publicação) sugerem que estes embriões de carrapato teriam a celularização já no primeiro dia de desenvolvimento embrionário.

Em embriões holometábolos de ordens mais derivadas, tais como dípteros, as divisões iniciais do material genético são bastante rápidas, durando de 8-12 minutos em *D. melanogaster*. Essas divisões ou clivagens são chamadas de superficiais, uma vez que nestas divisões nucleares (cariocinese) ocorrem sem a citocinese (divisão celular). Isto é realizado através da eliminação das fases de síntese do ciclo celular. Em *D. melanogaster*, após 10 ciclos de divisões metasincrônicas, os núcleos começam a migrar para o córtex (periferia). Esse estágio é chamado de blastoderma sincicial, uma vez que membranas ainda não isolam cada núcleo. A transição do blastoderma sincicial para blastoderma celular ocorre durante o 14º ciclo de divisões mitóticas, quando as membranas plasmáticas migram para o interior do ovo isolando cada núcleo. Assim, forma-se o blastoderma celular com as células organizadas na periferia e o interior permanece com o vitelo. Esse blastoderma celular ou epitélio primário fica logo abaixo da membrana vitelínica (Foe e Alberts, 1983). Nem todos os insetos seguem esse padrão em que os núcleos migram uniformemente para a periferia. Por exemplo, em embriões do Hemiptera *Oncopeltus fasciatus* e *Rhodnius prolixus* e do Orthoptera *Schistocerca gregaria* o processo de celularização ocorre primeiramente numa

região do ovo e somente depois nas demais (Ho e cols., 1997; Panfilio e cols., 2006).

Transição Materno-Zigótica.

Um evento fundamental que ocorre durante estágios precoces da embriogênese é a transição entre o uso de RNAsm maternos e o uso de mensagens zigóticas a chamada transição materno-zigótica (MZT). Em *D. melanogaster*, RNAsm e proteínas depositadas pela mãe durante a ovogênese são fundamentais durante as rápidas divisões nucleares que caracterizam as etapas sinciciais. Entre o ciclo mitótico 10 e o ciclo 14, onde as membranas celulares começam a se formar, RNAsm maternos são degradados por um processo finamente controlado, permitindo o início da transcrição do genoma zigótico (De Renzis e cols., 2007, Semotok e Lipshitz, 2007, Tadros e cols., 2007). Mutações que alteram esta transição alteram o tempo de entrada no processo de celularização, podendo tornar o embrião inviável (Lu e cols., 2009). A análise do transcriptoma de várias espécies indica que, de modo geral, todos os metazoários sofrem esta transição, variando o momento de sua ocorrência. Por exemplo, em camundongos esta transição se dá no estágio de duas células, enquanto que no díptero *D. melanogaster* descrito acima ela se completa pouco tempo antes da gastrulação (Baroux e cols., 2008). Em artrópodes a transição materno-zigótica foi analisada no mosquito *Anopheles gambiae* e no carrapato *Oncopeltus fasciatus* (Ewen-Campen e cols., 2011; Papatsenko e cols., 2011). A análise comparativa dos transcriptomas de *D. melanogaster* e *A. gambiae* mostra que vários genes que apresentam forte diminuição de expressão na MZT em *D. melanogaster* tem expressão continuada no mosquito, sugerindo que tais diferenças sejam base no processo de diversificação morfológica entre as espécies.

Formação das Células Germinativas.

Em várias espécies de insetos holometábolos (vespas, moscas, mosquitos e borboletas) uma parte especial do citoplasma dos ovócitos em formação é chamado de plasma germinal e contém as informações necessárias para a formação das células germinativas. O mecanismo genético de geração do plasma germinal e consequentemente das células germinativas depende de produtos maternos como os genes *nanos* e *oskar* em *Drosophila* (Wang e Lin, 2004; Kobayashi e cols., 1996, Ephrussi e cols., 1991). Durante a formação do blastoderma, células com morfologia característica, denominadas células polares, são observadas na região posterior do ovo de *Drosophila* e de outros insetos holometábolos com plasma germinal. Mutantes para *oskar* não formam células germinativas e são, consequentemente, estéreis (Ephrussi e cols., 1991). Por outro lado, a expressão ectópica de *oskar* na região anterior é capaz de gerar células germinativas nesta nova localização. Recentemente foi

demonstrado em mosquitos das espécies *A. gambiae* e *Ae. aegypti* que os genes *oskar* e *nanos* são expressos durante a ovogênese e embriogênese inicial (Juhn e James, 2006; Calvo e cols., 2005). Da mesma forma, no afídeo vivíparo *Acyrtosiphon pisum*, a localização de *nanos* e de um segundo marcador geral de linhagem germinativa, *vasa*, sugere seu envolvimento na especificação do plasma germinal e no desenvolvimento dessa linhagem (Chang e cols., 2006; Chang e cols., 2007). *vasa* também é expresso na linhagem germinativa de *A. gambiae* (Papathanos e cols., 2009), sugerindo um mecanismo conservado na geração do plasma germinal em dípteros.

Entretanto, na maior parte de insetos hemimetábolos, por exemplo, *R. prolixus*, baratas (*Periplaneta americana*), *Schistocerca gregaria* (Orthoptera) e no crustáceo *P. hawaiiensis* dentre outros o plasma germinal ou determinantes das células germinativas provavelmente não existem. Nestes animais evidências apontam para sinais específicos de células somáticas que fazem com que células vizinhas se tornem células germinativas, em particular as células do mesoderma (Ozhan-Kizil e cols., 2009). Assim, em insetos existem pelo menos duas maneiras de estabelecer as células germinativas, uma a partir de fatores germinativos depositados pela mãe durante a ovogênese e outra a partir de induções de células somáticas (Extavour, 2011; Lynch e cols., 2011; Figura 4).

Formação do Eixos Ântero-posterior em Embriões: Banda Curta e Banda Longa.

Durante o desenvolvimento embrionário dos artrópodes são definidos os eixos ântero-posterior (AP) e dorso-ventral (DV) que são fundamentais para a correta alocação dos futuros órgãos e segmentos dos insetos adultos. Em *Drosophila melanogaster*, onde o ovo cresce ao longo do eixo longitudinal durante a ovogênese na estrutura chamada de ovaríolo; o eixo AP é definido primeiro, enquanto que o eixo DV advém de um processo de perda de simetria que está diretamente relacionado à migração do núcleo haplóide do ovo em crescimento para uma região do córtex do ovo (Roth e Lynch, 2009). Embora este processo seja bastante conhecido a nível molecular em *D. melanogaster*, apenas recentemente foram obtidas as primeiras evidências que a mesma via de sinalização estaria com a padronização dos eixos AP e DV, a via de EGF, estaria envolvida em várias Ordens de insetos (Lynch e cols., 2010; Lynch e Roth, 2011).

Nos últimos 30 anos screenings genéticos realizados na mosca-da-fruta *D. melanogaster* foram capazes de determinar que cerca de 150 genes estão envolvidos no estabelecimento dos eixos de simetria AP e DV ao longo da ovogênese e embriogênese. Vários desses genes são providos como RNAm pela mãe, enquanto que uma fração ainda maior de genes são transcritos e traduzidos pelo zigoto após a transição materno-zigótica. Quatro sistemas maternos independentes estão envolvidos na padronização dos eixos AP e

DV, sendo três sistemas (anterior, posterior e terminal) envolvidos na padronização do primeiro eixo e apenas um sistema estaria envolvido na padronização do segundo eixo (St Johnston e Nusslein-Volhard, 1992).

Determinantes Anteriores - Em *D. melanogaster* moléculas essenciais para formação do eixo AP são localizadas no final do processo de ovogênese tanto na região anterior (*bicoid-bcd*) quanto posterior (*nanos-nos*) do ovo. Assim *bicoid* (*bcd*), um gene maternal tem seu RNAm localizado na região anterior do ovócito em *Drosophila* e após a fertilização um gradiente protéico de Bcd é formado, com concentrações maiores da proteína Bcd na região anterior e concentrações progressivamente mais baixas nas regiões posteriores do ovo. Assim, mutantes nulos para *bcd*, isto é, sem proteína Bcd ativa em *D. melanogaster* não formam a região correspondente aos segmentos da cabeça e tórax, enquanto que mutantes contendo pouca atividade de Bcd ainda formam os segmentos torácicos (Driever e Nusslein-Volhard, 1988a, b). Assim, Bcd se enquadraria num modelo clássico de um gradiente de um fator de transcrição que difundiria livremente da região anterior do ovo de *D. melanogaster* para regiões posteriores (Little e cols., 2011; Sample e Shvartsman, 2010).

Durante o desenvolvimento embrionário dos artrópodes são definidos os eixos ântero-posterior (AP) e dorso-ventral (DV) que são fundamentais para a correta alocação dos futuros órgãos e segmentos dos insetos adultos. Clássicos estudos da década de 90 demonstraram que Bicoid regula como fator de transcrição mais de dez genes zigóticos, indicando um papel fundamental deste gene na rede gênica de padronização AP (Simpson-Brose e cols., 1994; Small e cols., 1992). Por exemplo, o gene *hunchback* (*hb*) é transcrito zigoticamente em resposta a altas concentrações de Bcd, definindo a posição das estruturas anteriores do animal como cabeça e torax (Struhl e cols., 1989). Assim, esperar-se-ia que o gene *bcd* fosse encontrado no genoma de todos os insetos. Todavia, estudos nos últimos 10 anos demonstraram que *bcd* é restrito a um grupo de dípteros derivados, que possuem várias características peculiares incluindo o surgimento a partir de duplicação gênica de um gene bastante similar em sequência a *bcd*, o gene *zen* (Dearden e Akam, 1999; Stauber e cols., 2002). Assim, o gene responsável pela padronização da região anterior do eixo AP apareceu recentemente na evolução dos insetos, há cerca de 200 milhões de anos. É importante ressaltar que o genoma de mosquitos, besouros e todos os demais artrópodes não possuem um gene homólogo a *bcd* em seus genomas e até o presente momento não foram encontrados RNAsm que se localizem estritamente na região anterior durante a ovogênese nesses animais. Por outro lado, um gene homólogo a *bcd*, que também é fator de transcrição com domínio homeobox, *orthodenticle* (*otd*) é importante para a formação da região anterior (particularmente a cabeça) em aranhas, no besouro *Tribolium* e em vertebrados (Finkelstein e Boncinelli, 1994; Schroder, 2003). Bcd também reprime via Hb a tradução na região anterior do RNAm do determinante posterior *caudal* (*cad*), que encontra-se expresso de forma ubiquitária como depositado pela mãe (Schulz e Tautz, 1995). Assim, os determinantes moleculares da região anterior parece variar na evolução dos insetos e pouco se conhece a cerca desses mecanismos em artrópodes vetores.

Determinantes Posteriores - O sistema posterior atua de forma similar ao anterior: o RNAm do principal determinante posterior *nos* em *D. melanogaster*, dos mosquitos *Ae. aegypti* e *A. gambiae* e da vespa *Nasonia vitripennis* difunde para a região anterior. No entanto, apenas o RNAm nessa região posterior do ovo é traduzido. Ao contrário de Bcd, *Nos* não funciona como um regulador da transcrição, mas atua como um repressor da tradução do gene *hb* na região posterior, assim estabelece-se um gradiente da proteína Hb ao longo do eixo AP. A localização de RNAsm de determinantes restritos à região posterior é um processo ativo que inicia-se durante a ovogênese. Em *D. melanogaster* o RNAm de outro determinante posterior, *oskar*, é transportado ao longo de microtúbulos pela proteína motora quinesina até atingir sua localização final na região posterior do ovócito (Zimyanin e cols., 2008). Em outras espécies a localização posterior de determinantes celulares também foi observada, no entanto os mecanismos utilizados para a localização da proteína efetora final são variados. Por exemplo, enquanto na vespa *N. vitripennis* um gradiente do RNAm de *caudal* (*cdx*) controla o desenvolvimento posterior, em *D. melanogaster* o gradiente maternal da proteína Cdx é estabelecido por repressão da sua tradução de seu RNAm exercida por Bcd e Hb (Olesnický e cols., 2006). Outros mecanismos definem a região posterior nas espécies estudadas, especialmente quando se considera as diferenças temporais no desenvolvimento desta região entre insetos de banda longa e banda curta (veja abaixo Figura 5; Fonseca e cols., 2009).

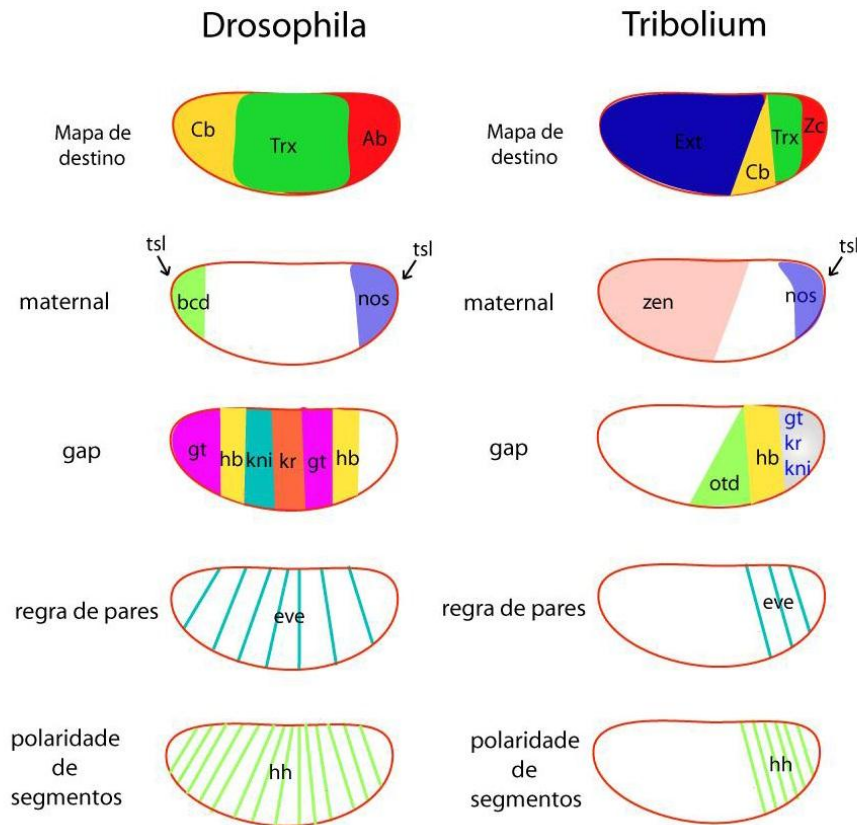


Figura 5: Embriogênese de *Drosophila*. Inseto banda longa e *Tribolium* banda curta. Cb (cabeça). Trx (tórax), Ab (abdômen) e Zc (zona de crescimento). Enquanto que a cabeça localiza-se aproximadamente no meio do ovo em embriões banda-curta se localiza na região anterior em embriões banda longa.

O Sistema Terminal - O último sistema AP maternal, o terminal, atua não por gradientes de grande amplitude como Bcd e Nos, mas através de um sinal envolvendo a via Torso-MAP quinase nos dois pólos do ovo de *D. melanogaster*. A ativação da via de Torso, receptor transmembrana presente na membrana plasmática do embrião depositado pela mãe, ativa a expressão dos genes zigóticos *tailless (tll)* e *huckebein (hkb)* nos polos do ovo. Diferente do resto do sistema AP, no entanto, Torso não regula estes genes diretamente, mas sim por diminuir a expressão do repressor Capicua. Na verdade, a correta especificação das estruturas terminais depende da integração de sinais do sistema AP e do terminal, de forma a refinar o padrão de expressão dos genes terminais (Cinnamon e cols., 2004; de las Heras e Casanova, 2006). No besouro *T. castaneum*, homólogos a genes do sistema terminal de *D. melanogaster* definem a zona de crescimento na região posterior do embrião, e no anterior a membrana extra-embriônica serosa. Portanto, em *T. castaneum* elementos do sistema terminal definem os pólos do embrião, apesar dos tecidos formados serem diferentes daqueles definidos em *D. melanogaster* (Schoppmeier e Schroder, 2005). Em *N. vitripennis* o efetor *tll* é expresso nos pólos do embrião, mas depende de *otd* para ativar sua expressão (Lynch e

cols., 2006), sugerindo que o sistema terminal e o sistema AP podem possuir alvos diferentes nos diversos artrópodes (Figura 5).

Esses gradientes AP maternos regulam os genes do tipo gap, estes últimos juntos com os genes maternos regulam os genes de regras de pares, que por sua vez regulam a expressão inicial dos genes de polaridade dos segmentos (Figura 5). Assim, todo o embrião é dividido em regiões cada vez menores com definições dos segmentos bem precocemente em *D. melanogaster* e demais dípteros. Parecem existir grandes diferenças na cascata de genes do tipo gap em dípteros, conforme demonstrado na comparação do díptero *A. gambiae* e *D. melanogaster* (Goltsev e cols., 2004). Em todos os insetos estudados até o presente momento, a identidade de cada segmento é determinada a partir da expressão de diferentes genes contendo o domínio homeobox, um domínio conservado de interação proteína-DNA, que obedece ao chamado código Hox ao longo do eixo AP (Veraksa e cols., 2000).

Embora o conhecimento do processo de formação do eixo AP em *D. melanogaster* seja bastante importante, este conhecimento não pode ser diretamente estendido a outros artrópodes basais como quelicerados ou mesmo outros insetos holometábolos, uma vez que em *D. melanogaster* e outros dípteros a região do primórdio do embrião, a banda ou disco germinal, ocupa toda a extensão do ovo. Esta banda germinal, chamada de germinal longa é encontrada em Diptera (moscas, mosquitos, etc), Lepidoptera (mariposas, borboletas) Hymenoptera (vespas, abelhas, formigas) e em alguns Coleoptera (besouros) (Sander, 1976) (Figura 6).

Outro tipo de desenvolvimento embrionário acontece nos insetos banda germinal do tipo curta ou intermediária. Em Orthopterans (*Gryllus gryllus* e *S. gregaria*, por exemplo), a banda germinal é bastante curta formando-se inicialmente apenas os segmentos da cabeça (Figura 6). Os segmentos do tórax e do abdômen são gerados num segundo momento a partir de células da zona posterior. Sugere-se que a geração dos segmentos posteriores ocorra por proliferação de células a partir da zona posterior destes insetos banda curta, formando-se assim novos segmentos. Enquanto que em embriões banda longa como *D. melanogaster* a expressão de genes de polaridade de segmento como *engrailed* são detectadas simultaneamente ao longo do eixo AP, em embriões banda-curta como o besouro *T. castaneum*, o RNAm de *engrailed* aparece sequencialmente ao longo do eixo AP, com adição sequencial na região da zona de crescimento (Zc na Figura 5, revisto em Davis e Patel, 2002b).

A

	Panoístico	Meroístico			
		telotrófico		politrófico	
Banda germinal	Schistocerca	Rhodnius	Tribolium	Aedes	Drosophila
Embriogênese	20	10	4	3	1

B

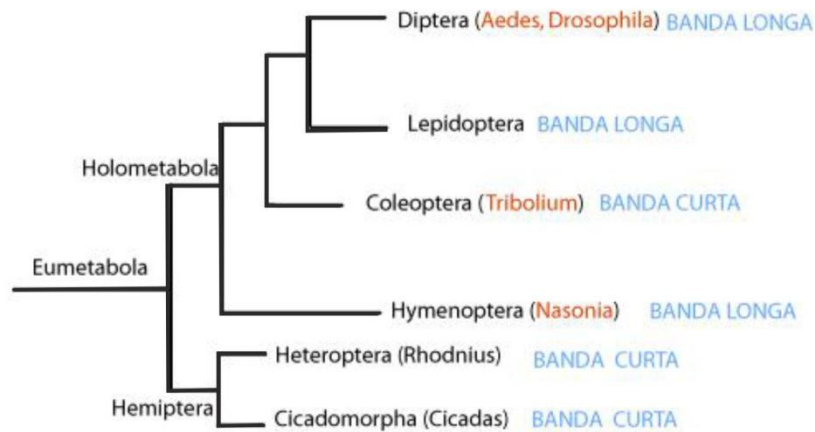


Figura 6: (A) Tamanho da banda germinal nos diferentes insetos (azul) em relação ao tamanho do ovo e o tipo de ovogênese. (B) Representação esquemática das principais espécies discutidas no texto (vermelho) e o tipo de embriogênese presente nas mesmas (azul).

Nos últimos anos vários estudos tem demonstrado uma grande variação no controle materno da formação do eixo AP em artrópodes (veja acima) bem como na cascata de genes do tipo gap (revisto em Jaeger, 2011). Em linhas gerais, em insetos banda curta parece haver uma maior interação entre a rede zigótica composta pelos genes do tipo gap e de regra de pares na região posterior (Choe e cols., 2006). Além disso, foi demonstrado que em quelicerados como a aranha *Cupennius salei* uma via de sinalização importante para a geração de segmentos em vertebrados, a via de sinalização de Notch, também seria essencial para a geração dos segmentos a partir da zona posterior nesta aranha (Stollewerk e cols., 2003). É importante ressaltar que a região posterior nestes animais forma os precursores comuns do ectoderma e do mesoderma simultaneamente. Estudando o papel da via de sinalização de

Notch na aranha *A. tepidariorum* outros autores concluíram que Notch estaria envolvido na decisão dos precursores entre a diferenciação em mesoderma e ectoderma e não no processo de segmentação propriamente dito (Oda e cols., 2007).

Algumas diferenças importantes podem ser destacadas quando comparamos embriões de banda germinal curta e longa. Primeiro, em embriões banda longa a região mais anterior corresponde a futura região da cabeça e a mais posterior ao abdomen. Pelo menos em *D. melanogaster* e na vespa *Nasonia vitripennis* foram observados RNAs maternos que uma vez localizados serão responsáveis por padronizarem o eixo AP. Segundo, embriões de banda curta dividem seu processo de padronização em uma fase inicial em que os segmentos anteriores da cabeça são padronizados e um secundário em que a zona posterior é responsável pela geração de novas células que darão origem a região abdominal (revisto em Fonseca e cols., 2009). Terceiro, logo nos estágios iniciais de desenvolvimento existe uma diferença extrema no modo e na velocidade de formação das membranas plasmáticas entre os ovos com embriogênese mais lenta, em geral de banda curta, e os de embriogênese rápida como *D. melanogaster* em geral banda longa. Enquanto nos primeiros membranas celulares existem e limitam a difusão de fatores de transcrição livremente pelo ovo, nos últimos, fatores de transcrição podem estabelecer os diversos territórios AP que no final corresponderão aos domínios de expressão dos genes de polaridade de segmentos.

Formação do eixo dorsoventral - O estudo da formação do eixo dorsoventral em insetos tem avançado bastante ao longo dos últimos anos. Inicialmente, estudos de indução de mutações no inseto-modelo *D. melanogaster* demonstraram que a padronização DV é em grande parte controlada por fatores maternos. A informação fundamental para a formação DV encontra-se na região ventral do embrião sendo transmitida através da via de sinalização de Toll, que em vertebrados e insetos também está envolvida com a resposta imune (revisto em Moussian e Roth, 2005; Hetru e Hoffmann, 2009). Outra via maternal, a via de Dpp, também influencia a via de sinalização de Toll (Araujo e Bier, 2000; Carneiro e cols., 2006; Fontenele e cols., 2009; Negreiros e cols., 2010). Durante a embriogênese de *D. melanogaster* estas duas vias de sinalização estabelecem pelo menos quatro regiões ao longo do eixo DV: o mesoderma, localizado ventralmente, o ectoderma neurogênico e não neurôgeno nas regiões laterais e a amnioserosa na região mais dorsal do ovo. A geração do sinal ventralizante, isto é, o que é responsável por determinar qual região será a ventral envolve pelo menos 17 fatores maternos envolvidos com a via de Toll e pelo menos mais nove fatores com a via de Dpp. Estes últimos são responsáveis por modular a via de Toll.

As informações fundamentais para a formação do eixo DV são originadas durante a ovogênese na camada de células foliculares, uma monocamada de epiteliais somáticas, que envolve o complexo ovócito-células nutridor. Fatores derivados das células foliculares tais como as proteínas intracelulares Pipe (Pip), Slalom (Sll) e Windbeutel (Wbl), reguladores da síntese de proteoglicanos, e a protease secretada Nudel (Ndl), são requeridos para ativar uma cascata de proteases incluindo Gastrulation Defective, Snake e Easter. Estas proteases são secretadas como precursores inativos pelo ovócito

ou durante os estágios iniciais de clivagem. Sua ativação culmina com a geração do gradiente do morfógeno Spätzle (Spz), com maiores níveis na região ventral do espaço perivitelinico. Spätzle (Spz) então se liga ao receptor transmembranar Toll (Tl) presente de forma uniforme no embrião recém depositado de *Drosophila*. O sinal, agora no interior do embrião, transloca-se para o núcleo a partir da ação das proteínas adaptadoras Krapfen/dMyd88 e Tube (Tub) e a quinase Pelle. Esta cascata intracelular leva à degradação do inibidor homólogo de I κ B, Cactus (Cact), o que permite ao fator de transcrição da família NF κ B entrar no núcleo e ativar ou inibir a expressão de genes zigóticos requeridos para a especificação dos destinos celulares ao longo do eixo dorso-ventral (revisto em Moussian and Roth, 2005, Figura 7).

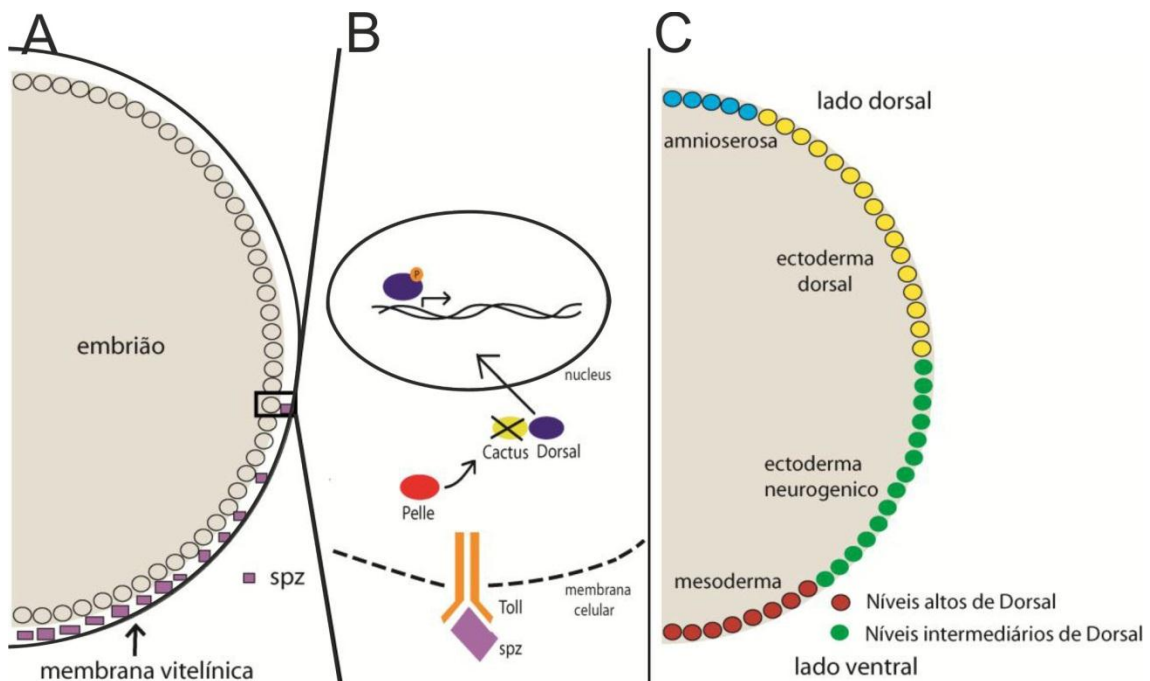


Figura 7: Principais passos envolvidos na via de sinalização de Toll e na formação do eixo dorsoventral. (A) Representação esquemática da metade ao final da ovogênese o ligante de Toll Spätzle é encontrado em grandes quantidades na futura região ventral. (B) A ativação da via de Toll na região ventral leva a degradação de Cactus e a importação de Dorsal para o núcleo. (C) Na região mais ventral altos níveis de Dorsal são responsáveis por ativar genes mesodermiais tais como *twist* e *snail*. No ectoderma neurogênico (verde) níveis intermediários de Dorsal são responsáveis por ativar *vnd*, *ind* bem como outros genes neurogênicos.

Análises realizadas nos últimos anos demonstraram que a via maternal de Dpp também tem papel crucial no estabelecimento do eixo DV, tanto do folículo ovariano quanto do embrião. Os fatores secretados Sog, Tld, Tlr, e Tsg atuam durante a ovogênese modulando a distribuição de Dpp (Araujo e Bier, 2000; Carneiro e cols., 2006; Negreiros e cols., 2010, revisto em Araujo e cols., 2011), que junto com a via de EGF estão envolvidos em padronizar a futura região dorsal do ovócito em crescimento e suas estruturas anexas, tais como seus apêndices dorsais. Além disto, Dpp é depositado como proteína no espaço perivitelínico do futuro embrião, ativando sua via de sinalização através de componentes maternos durante a embriogênese. Assim, em *D. melanogaster* a via maternal de Dpp seria importante para a padronização DV no embrião.

A questão que tem sido mais recentemente abordada é de quanto o conhecimento obtido em *D. melanogaster* pode ser aplicado a outros insetos. Um dos passos cruciais para a padronização DV em *D. melanogaster* é a migração do núcleo haplóide do ovócito em desenvolvimento para o córtex anterior numa posição assimétrica ao longo do futuro eixo DV. Na posição final do núcleo o ligante de EGF, chamado Gurken, é secretado para as células foliculares localizadas logo acima. Gurken ativa, então, a via de sinalização de EGF nestas células e também atua à distância através da inibição da transcrição da sulfotransferase *pipe*, que é somente expressa nas células foliculares ventrais. Recentemente, Lynch e colaboradores (Lynch e cols., 2010) demonstraram que a migração do núcleo e a sinalização pela via de EGF são características típicas de insetos, uma vez que as várias ordens estudadas se utilizam desta via para a padronização DV. Por outro lado, *pipe* parece não estar envolvido nesse processo nos demais insetos estudados, sugerindo modificações nas vias maternas requeridas para a formação do eixo DV. Assim, a questão se a via de Dpp também é importante maternalmente em outros insetos ainda encontra-se aberta.

Durante a embriogênese o sinal ventralizante de Spatzle ativa Toll na região ventral e lateral fazendo com que altos níveis de Dorsal sejam estabelecidos na região mais ventral, que corresponderá ao futuro mesoderma. A região lateral conta com progressivas menores concentrações de Dorsal ao longo do eixo DV, estabelecendo, assim, as regiões do ectoderma neurogênico e não-neurogênico (revisto em Moussian e Roth, 2005). Interações entre genes zigóticos são fundamentais para a correta padronização e refinamento desses tecidos.

Estudos recentes de genômica determinaram que Dorsal como fator de transcrição se liga diretamente a cerca de 80 genes zigóticos que são diferencialmente expressos ao longo do eixo DV (Sandmann e cols., 2007; Zeitlinger e cols., 2007). Assim, os fatores de transcrição *twist* e *snail* seriam essenciais para a formação do mesoderma, enquanto *ventral nervous defective* (*vnd*), *intermediate nervous defective* (*ind*) e *muscle segment homeobox* (*msh*) são fundamentais para as regiões ventral, lateral e dorsal do sistema nervoso. Na região do ectoderma dorsal a concentração nuclear de Dorsal é bastante baixa, sendo que nesta região Dorsal atua como um repressor (Jiang e cols., 1992). Na região mais dorsal do ovo, onde a amnioserosa é especificada, a via

zigótica de sinalização de Dpp é responsável por prover a informação posicional (revisto em Araujo e cols., 2011, Figura 7).

Assim, o modelo mais aceito a cerca da regulação dos genes-alvo de Dorsal é que estes possuem sequências regulatórias contendo sítios de ligação em que este fator de transcrição se liga. Em regiões ventrais, onde a quantidade de Dorsal é bastante grande, genes responsivos a Dorsal apresentam em sua sequência sítios de ligação de baixa afinidade, enquanto que genes expressos em regiões laterais sítios regulatórios com maior afinidade para Dorsal. Logo, na região dorsal do ovo pequenas mudanças na concentração de Dorsal podem ter efeitos bastante importantes para a ativação de genes-alvo. O vasto conhecimento das sequências regulatórias destes genes nos últimos anos tem transformado a rede regulatória gênica (“gene regulatory network”) responsável pela padronização DV num dos principais processos em que a morfogênese e as interações moleculares são profundamente conhecidas (revisto em Stathopoulos e Levine, 2005).

Quanto desse processo de padronização DV é conservado em outros artrópodes? Aparentemente as duas vias de sinalização de Toll e Dpp estão envolvidos na padronização DV pelo menos no ancestral comum dos insetos hemi e holometábolos que viveu a cerca de 300 milhões anos. Todavia, a importância de cada uma dessas vias parece diferir quando comparamos as diversas Ordens de insetos. No besouro *T. castaneum* a via de Dpp é fundamental para a padronização do sistema nervoso, ao contrário de *D. melanogaster* onde a via de Toll é a principal responsável por padronizar esta região (Nunes da Fonseca e cols., 2008). Outra diferença bastante clara obtida por análises comparativas é o maior papel do genoma zigótico em insetos pertencentes a grupos mais primitivos, e.g. *T. castaneum*, em relação ao extenso controle maternal existente em dípteros derivados como *D. melanogaster*. Recentemente demonstramos que interações a nível zigótico de moduladores de Dpp e Toll são responsáveis pela padronização do eixo DV em *T. castaneum* (revisto em Fonseca e cols., 2009).

Esses achados moleculares corroboram estudos da primeira e início da segunda metade do século XX que demonstraram a existência de mecanismos auto-regulatórios em ovos de insetos pertencentes a grupos basais. O embriologista alemão Klaus Sander demonstrou que ao separar mecanicamente as futuras regiões ventrais e dorsais de um ovo do Hemiptera Cicadellidae *Eucelis* dois embriões eram gerados. Tal resultado demonstrou que algumas espécies basais possuíam capacidade de se auto-regular (Sander, 1971, 1976), isto é formar mais de um embrião a partir de um ovo. Experimentos similares com embriões de *D. melanogaster* demonstraram pouca capacidade auto-regulativa nestes ovos. Assim em dípteros derivados os destinos celulares seriam determinados bastante precocemente a partir de gradientes maternais e de forma irreversível no desenvolvimento.

Assim, parecem haver diferenças importantes quando se compara a padronização DV em diferentes espécies, as quais se tornam mais evidentes quando se inclui nesta análise embriões de artrópodes pertencentes a grupos basais tais como quelicerados (aranhas, carrapatos, etc). Nesses animais acredita-se que a padronização DV dependa largamente do genoma zigótico e que a perda da simetria e o estabelecimento do eixo DV envolva de forma acentuada a via de sinalização de Dpp. Na aranha *A. tepidariorum* Dpp e seus

moduladores são aparentemente responsáveis pela padronização de todas regiões DV (Akiyama-Oda e Oda, 2006, Fonseca e cols., 2009).

Logo, uma hipótese plausível seria que ancestralmente os artrópodes utilizariam um sistema para padronização DV usando a via de sinalização de Dpp e que na evolução dos insetos a via de sinalização de Toll teria sido co-optada de sua função original na imunidade para a padronização DV (Fonseca e cols., 2009). Assim, embora estudos iniciais tenham proposto que a padronização DV envolve uma rede regulatória de moléculas evolutivamente conservadas, em particular a via de sinalização de Dpp, tem se tornado claro que diversas diferenças existem entre artrópodes (Oda e Akiyama-Oda, 2008). Estas diferenças podem ser correlacionadas, por exemplo, com a extensa diversidade dos ovos de artrópodes bem como com a existência de camadas envoltórias e protetoras dos ovos de insetos, as membranas extra-embrionárias.

Formação das Membranas Extra-embrionárias em Insetos.

As duas membranas extra-embrionárias serosa e o âmnion podem ser considerados como uma invenção típica dos insetos possuidores de asas (pterigotos). Quelicerados como carrapatos não possuem membranas extra-embrionárias envolvendo o embrião. Insetos primitivamente sem asas (apterigotos) muitas vezes possuem apenas uma membrana extra-embrionária a serosa ou o amnion, e dípteros derivados de desenvolvimento embrionário rápido, como *D. melanogaster*, possuem somente uma membrana bastante reduzida, a amnioserosa, localizada na região dorsal do ovo (revisto em Panfilio, 2008; Roth, 2004).

Embora não se tenha uma visão completa de muitos grupos informativos para a origem dessas membranas extra-embrionárias foi proposto que a formação do amnion e a serosa seriam simplesmente consequência de forças físicas que ocorrem durante a embriogênese. Assim que formadas, várias funções importantes podem ser realizadas por essas membranas. É importante ressaltar que cada um dos dois maiores grupos de animais com simetria lateral dos deuterostomos e protostomos, os vertebrados amniotos (mamíferos e répteis) e os insetos, respectivamente foram os mais bem sucedidos na terra com relação ao número de espécies e habitats ocupados. Essas membranas extra-embrionárias têm origem independente, ou seja, não possuem um ancestral comum em amniotos e insetos (revisto em Panfilio, 2008; Roth, 2004).

Parece que o desenvolvimento das membranas extra-embrionárias é correlacionado com o aparecimento e a diversificação de um programa genético envolvendo o aparecimento de um gene *Hox3* derivado, o gene *zerknüllt* (*zen*). Em artrópodes pertencentes a grupos basais, que não possuem membranas extra-embrionárias, apenas o gene *Hox3* encontra-se no genoma (Hughes e Kaufman, 2002; Damen e Tautz, 1998). Em insetos uma duplicação do gene *Hox3* levou ao aparecimento do gene *zen* que parece ser responsável pela especificação das membranas extra-embrionárias em todas as Ordens de

insetos estudadas até hoje (Stauber e cols., 1999). Os movimentos e a biomecânica das células extra-embrionárias foram estudadas recentemente no hemiptera *Oncopeltus fasciatus* e demonstraram que estas membranas são essenciais para a embriogênese neste inseto (Panfilio, 2009; Panfilio e Roth, 2010). Embriões que não expressam *zen1*, através da interferência de RNA, tanto em *T. castaneum* quanto em *Oncopeltus fasciatus* não desenvolvem a serosa, uma membrana extra-embrionária muito importante (Panfilio e cols., 2006; van der Zee e cols., 2005). É interessante notar que em condições de laboratório embriões de *T. castaneum* conseguem se desenvolver e eclodir mesmo na ausência de serosa, todavia não se sabe se em condições extremas no ambiente natural eles se desenvolveriam.

Durante o desenvolvimento embrionário precoce, logo após a formação do disco blastodermal, tipicamente nos insetos acontece a diferenciação dos dois envelopes protetores ou membranas: uma serosa externa, que se diferencia diretamente do disco blastodermal e o amnion interno que se diferencia das regiões adjacentes ao disco germinal. Assim, durante o desenvolvimento embrionário típico dos insetos o embrião é envolvido pelo amnion, criando a cavidade amniótica, e pela serosa que o envolve o embrião e o amnion (Figura 8). Este processo em que o embrião é envolto pela serosa e pelo amnion, ocorre concomitantemente com o processo de gastrulação (descrito abaixo). Em várias Ordens tais como Hymenoptera, que incluem vespas e abelhas, o amnion começa a se formar porém degenera cedo ao longo do desenvolvimento, ou apenas possui uma estrutura que recobre o vitelo ao invés do embrião. Dipteros derivados, incluindo a mosca-da-fruta *D. melanogaster* possuem uma única membrana extra-embrionária que recobre apenas a região dorsal do embrião.

Assim, dentre os artrópodes vetores temos os carrapatos tais como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que não possuem membranas extra-embrionárias e hemípteras como *R. prolixus* e mosquitos como o *Ae. aegypti* com serosa e amnion evidentes. A presença ou ausência de membranas extra-embrionárias possui extensa correlação com a estrutura do córion que reveste o ovo. A camada do córion contendo lipídeos, e outros componentes parece ser de fundamental importância no habitat natural dos ovos (Hinton, 1981, Panfilio, 2008).

Dois processos importantes acontecem com as membranas extra-embrionárias. Primeiro deve existir uma correta fusão do amnion com a serosa, que geralmente começa a acontecer na região da cabeça. Na falta da fusão correta como em embriões RNAi para *zen2* em *Tribolium*, o embrião pode se fechar de forma invertida com o sistema nervoso permanecendo na região externa e a epiderme internamente (van der Zee e cols., 2005). Um segundo evento é no fechamento dorsal, que envolve a extensa morte celular das membranas extra-embrionárias em particular a serosa (Panfilio e Roth, 2010). Esse fechamento é fundamental para a internalização dos órgãos bem como a manutenção da epiderme intacta. Estudos funcionais dessas membranas em insetos vetores, nos últimos anos, têm demonstrado que particularmente a serosa parece ser importante para secretar uma cutícula protetora chamada de cutícula serosa, que possui papel fundamental no fenômeno da resistência a dessecação (Goltsev e cols., 2009; Papatsenko e cols., 2011). O estudo do mecanismo genético envolvido com a padronização dessa cutícula é uma área

promissora de interface entre o estudo da embriologia de vetores e possíveis ações de controle através do desenho de inibidores específicos.

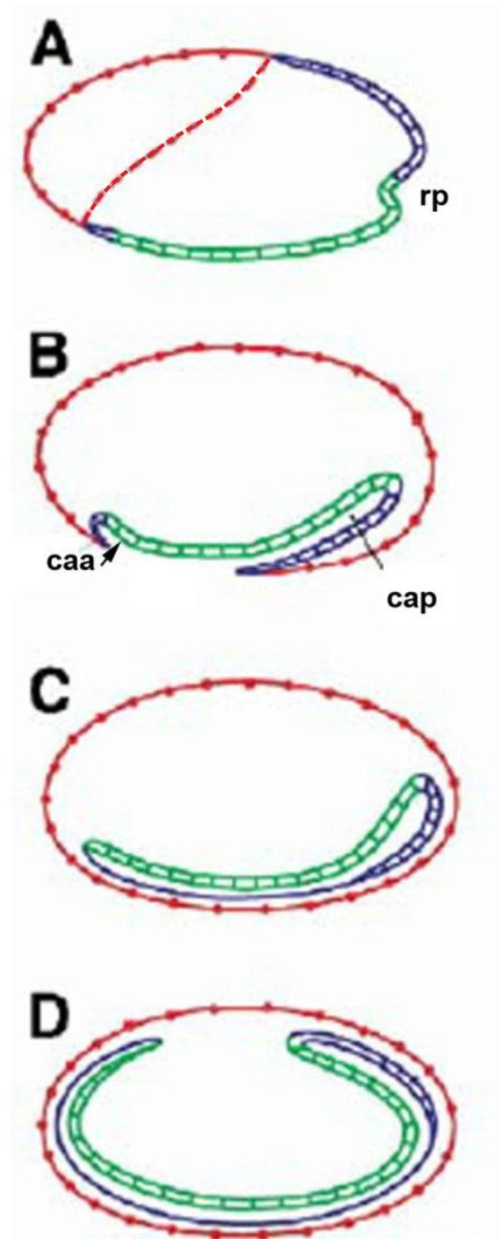


Figura 8: Movimentos acrobáticos das membranas extra-embrionárias em insetos. Adaptado a partir de Van der Zee e cols, 2005. Representação de embriões de *Tribolium* e o processo de gastrulação. Em vermelho é representada a serosa, em azul o amnion e em verde o embrião propriamente dito. (pp) – Região posterior. (cap) – cavidade amniótica posterior, (caa) – cavidade amniótica anterior.

Gastrulação em Artrópodes: Formação do Mesoderma.

Um dos principais eventos da embriogênese em organismos multicelulares é a separação dos grupos celulares em três camadas germinativas, o ectoderma, o mesoderma e o endoderma e este processo é denominado gastrulação. Em geral, tanto em vertebrados quanto em invertebrados, células derivadas do ectoderma darão origem à regiões externas do corpo (epiderme) e ao sistema nervoso, do mesoderma a músculos e sangue e do endoderma ao tubo digestório e seus anexos. Em artrópodes, quase todo conhecimento do processo celular e molecular envolvido na formação do mesoderma e do tubo digestório é proveniente do inseto-modelo *D. melanogaster*. O desenvolvimento de *D. melanogaster* é bastante diferente dos demais insetos, um banda longa, conforme descrito acima.

Dentre essas diferenças da embriogênese de *D. melanogaster* se comparada com outros insetos é em relação ao modo de invaginação do mesoderma (Tipo I na Figura 9, revisto em Roth, 2004). Em *D. melanogaster* a invaginação do mesoderma é controlada pelo sistema dorsoventral, principalmente pelos fatores de transcrição *dorsal*, *twist* e *snail* (revisto em Nunes da Fonseca e cols., 2009). *twist* pode ser considerado um controlador-mestre para o desenvolvimento do mesoderma em *D. melanogaster* uma vez que embriões mutantes para *twist* não desenvolvem mesoderma. O mecanismo de invaginação do mesoderma é excelente para estudos comparativos em insetos devido à existência de um vasto conhecimento ao nível celular e molecular deste processo, incluindo filmagens ao vivo em tempo real de todo processo em *D. melanogaster* (McMahon e cols., 2008).

Uma das principais justificativas para a análise da formação do mesoderma em diferentes artrópodes é a grande variação morfológica deste processo em seus diferentes grupos. Enquanto em *D. melanogaster* existe uma completa inibição de mitoses na região do mesoderma e um movimento coordenado destas células durante a invaginação, descrições morfológicas na era pré-molecular demonstraram a existência de pelo menos dois outros tipos de formação do mesoderma em insetos filogeneticamente basais (Tipo II e Tipo III). Na formação do mesoderma tipo II, observada em *N. vitripennis* (vespa) e *Apis mellifera* (abelha), o mesoderma se desgruda do ectoderma adjacente como uma placa contínua, sem modificar a morfologia de suas células (Figura 9, revisto em Roth, 2004). Na formação do mesoderma do tipo III, observado em insetos bastante primitivos como libélulas (Odonata – “dragonflies”), a ingressão de células ocorre através de um processo estocástico, onde células aparentemente proliferam e ingressam no interior do embrião individualmente (Figura 9, revisto em Roth, 2004). Recentemente, foi proposto que a aranha *A. tepidariorum* (quelicerado) não forma o mesoderma como estrutura mais ventral do embrião e sob o controle da cascata molecular dorsoventral (revisto em Nunes da Fonseca e cols., 2009), indicando que este processo é diferente ao nível de controle molecular em aranhas e moscas-da-fruta. Concluindo, existe uma aparente flexibilidade no controle molecular da formação do mesoderma em artrópodes e a investigação de como esta camada germinativa é padronizada ao nível molecular e celular nos ajudará a entender as tendências macro-evolutivas que ocorreram no Filo que possui o maior número de espécies do Reino Animal.

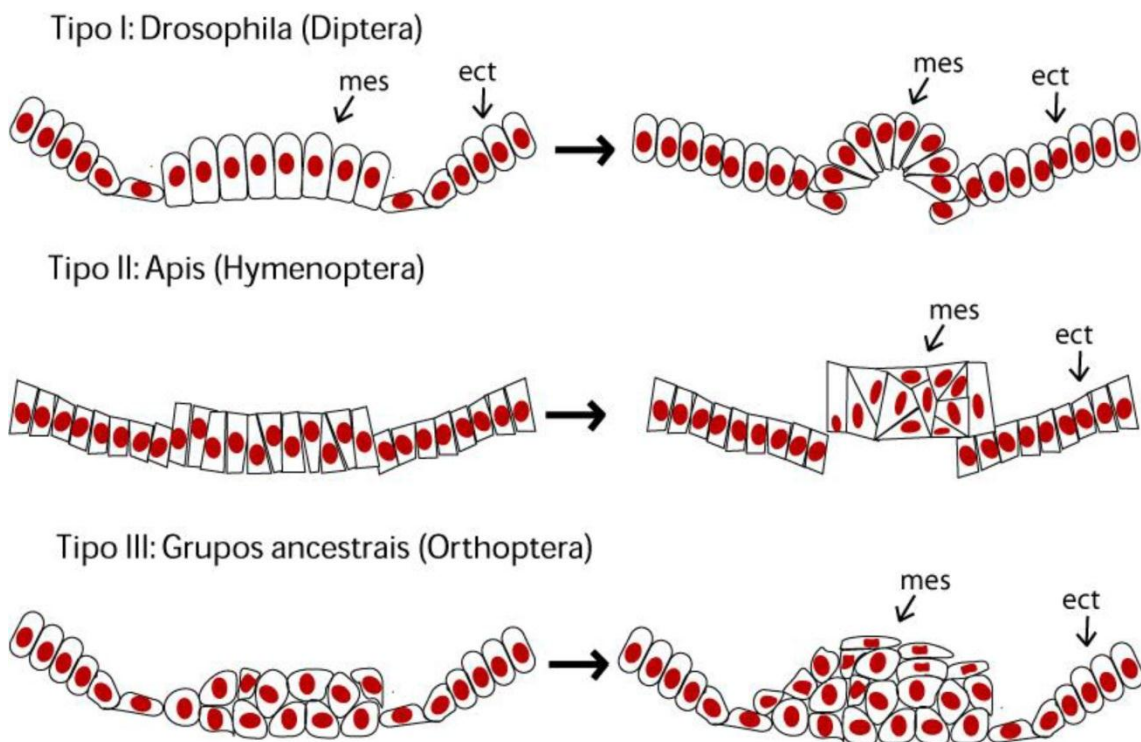


Figura 9: Tipos de invaginação do mesoderma em insetos. Ectoderma (ect), Mesoderma (mes). Em grupos ancestrais (Orthoptera) a invaginação do mesoderma ocorre de forma estocástica e aparentemente desorganizada, o chamado Tipo III. Em *Apis mellifera* a invaginação do mesoderma ocorre como uma placa única (Hymenoptera-Tipo II) e o ectoderma recobre o mesoderma na região ventral. Em *Drosophila melanogaster* a invaginação do mesoderma ocorre em forma de roseta em uma população única ao longo de todo eixo ântero-posterior (AP). Adaptado a partir de Roth, 2004.

Formação do Tubo Digestório e Endoderma em Artrópodes

O tubo digestório em *D. melanogaster* é formado por uma porção ectodermal e uma porção endodermal. São considerados componentes ectodermais do tubo digestório o estomodeo, o proctodeo e os túbulos de malpighi (excreção), uma vez que estes componentes apresentam caráter epitelial assim como a epiderme, e nunca demonstram características mesenquimais (Reuter, 1994). O endoderma, propriamente dito, é composto pelas regiões anteriores e posteriores do intestino médio, que são inicialmente localizadas adjacientemente ao proctodeo e o estomodeo. O endoderma é internalizado concomitantemente com o proctodeo e o estomodeo, estruturas ectodermas (Reuter, 1994, Figura 10). O endoderma passa por uma transição ecto-mesenquimal e somente ao final do seu processo de diferenciação suas células adquirem novamente seu caráter epitelial. Os chamados núcleos vitelínicos ("yolk nuclei"), ou vitelofágos primários também têm função

digestória, embora não façam parte desse tubo digestório propriamente dito em *D. melanogaster* (Walker e cols., 2000). Foi proposto por vários autores que os vitelófagos seriam integrados ao tubo digestório em insetos primitivos e quelicerados, embora não exista prova conclusiva (revisto em Roth, 2004).

Em *D. melanogaster*, o controle genético da formação do tubo digestório envolve a cascata maternal que ativa a via de sinalização do receptor tirosina-quinase Torso (Figura 5, Figura 10) nas regiões anterior e posterior do embrião, o chamado sistema terminal (St Johnston e Nusslein-Volhard, 1992). Esta cascata leva a ativação no embrião dos fatores de transcrição zigóticos *tailless (tll)* e *huckebein (hkb)*, que são, por sua vez, responsáveis pela ativação de vários outros genes-alvo envolvidos na padronização do tubo digestório. O gene *fog*, necessário para invaginação do mesoderma, também é requerido nas células do proctodeo para este mesmo processo, uma vez que mutantes para *fog* não realizam a invaginação do proctodeo. Vários fatores de transcrição são requeridos nas porções do proctodeo (ectoderma) como *brachyury* e *forkhead*, sendo este último gene também requerido no ectoderma anterior para a correta especificação do estomodeo (Murakami e cols., 2005). Outros fatores de transcrição como os da família GATA, tais como *serpent(srp)* e *GATAe*, são fundamentais para a padronização do endoderma (intestino médio). Concluindo, a cascata de fatores envolvidos na formação do tubo digestório é bem conhecida em *D. melanogaster* e poucos estudos investigaram este processo a nível molecular em outros artrópodes.

Ao contrário de vertebrados, em *D. melanogaster* o endoderma e o mesoderma são especificados antes da gastrulação por gradientes maternos, fato que é correlacionado com o desenvolvimento bastante rápido da mosca-da-fruta. Por outro lado, artrópodes mais primitivos têm, em geral, embriogênese mais longa sendo possível que genes zigóticos tenham maior participação na especificação do tubo digestório. Análises preliminares utilizando o besouro *T. castaneum* demonstraram diferenças importantes neste mecanismo de padronização do tubo digestório (Schroder e cols., 2000), tais como diferenças entre a padronização da região anterior e posterior do tubo digestório. Em *T. castaneum* a região mais anterior do ovo não dá origem ao estomodeo, mas sim a serosa. Assim a sua padronização, caracterizada pela expressão de *Tc-fkh* ocorre somente zigoticamente, após o processo de gastrulação. Concluindo, o controle molecular do processo de formação do sistema digestório envolvendo suas populações endodermas e ectodermas durante a embriogênese sofreu modificações ao longo da evolução dos artrópodes.

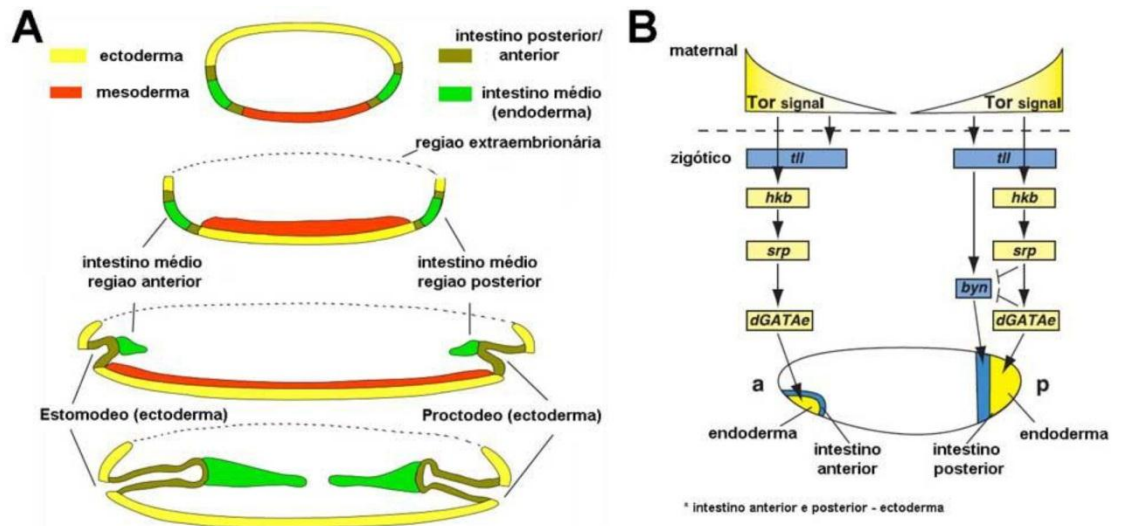


Figura 10: (A) Formação do intestino em *D. melanogaster* envolve a migração do ectoderma e do endoderma das regiões anterior e posterior. (B) Cascata de fatores envolvidos na padronização do endoderma de *Drosophila*. (A) Adaptado a partir de Roth, 2004 e (B) Adaptado a partir de Murakami e cols., 2005 .

Considerações Finais.

As discussões apresentadas durante o presente capítulo sobre a embriogênese de artrópodes demonstram a vasta literatura e conhecimento destes processos no inseto-modelo *Drosophila melanogaster* e todo o vasto e inexplorado campo da embriogênese molecular dos artrópodes vetores. Nos últimos anos estudos de embriologia molecular com outras espécies de artrópodes tem levado a descoberta dos aspectos conservados e divergentes entre os diferentes grupos. Acreditamos que o recente avanço dos genomas e transcriptomas e as técnicas de perda de função (iRNA) irão permitir uma melhor compreensão dos aspectos morfo-funcionais das espécies vetoras de interesse nacional.

Referências Bibliográficas.

Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2006. Axis specification in the spider embryo: *dpp* is required for radial-to-axial symmetry transformation and *sog* for ventral patterning. *Development* 133, 2347-2357.

Araujo, H., Bier, E., 2000. *sog* and *dpp* exert opposing maternal functions to modify toll signaling and pattern the dorsoventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 127, 3631-3644.

Araujo, H., Fontenele, M.R., da Fonseca, R.N., 2011. Position matters: Variability in the spatial pattern of BMP modulators generates functional diversity. *Genesis* 49, 698-718.

Baroux, C., Autran, D., Gillmor, C.S., Grimanelli, D., Grossniklaus, U., 2008. The maternal to zygotic transition in animals and plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 89-100.

Bastock, R., St Johnston, D., 2008. *Drosophila* oogenesis. *Curr Biol* 18, R1082-1087.

Buning J (1994) The insect ovary. Ultrastructure, Previtellogenic Growth and Evolution. Chapman & Hall, London

Calvo, E., Walter, M., Adelman, Z.N., Jimenez, A., Onal, S., Marinotti, O., James, A.A., 2005. Nanos (nos) genes of the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 789-798.

Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V., 1985. The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin.

Campos, E., Moraes, J., Facanha, A.R., Moreira, E., Valle, D., Abreu, L., Manso, P.P., Nascimento, A., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H., Masuda, A., Vaz Ida, S., Jr., Logullo, C., 2006. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Vet Parasitol* 138, 349-357.

Carneiro, K., Fontenele, M., Negreiros, E., Lopes, E., Bier, E., Araujo, H., 2006. Graded maternal short gastrulation protein contributes to embryonic dorsal-ventral patterning by delayed induction. *Dev Biol* 296, 203-218.

Chang, C.C., Lee, W.C., Cook, C.E., Lin, G.W., Chang, T., 2006. Germ-plasm specification and germline development in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: Vasa and Nanos as markers. *Int J Dev Biol* 50, 413-421.

Chang, C.C., Lin, G.W., Cook, C.E., Horng, S.B., Lee, H.J., Huang, T.Y., 2007. Apvasa marks germ-cell migration in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Dev Genes Evol* 217, 275-287.

Chapman, R., 1998. The insects, structure and function, 4th Edition ed. Cambridge University Press.

Choe, C.P., Miller, S.C., Brown, S.J., 2006. A pair-rule gene circuit defines segments sequentially in the short-germ insect *Tribolium castaneum*. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 6560-6564.

Cinnamon, E., Gur-Wahnon, D., Helman, A., St Johnston, D., Jimenez, G., Paroush, Z., 2004. Capicua integrates input from two maternal systems in *Drosophila* terminal patterning. Embo J 23, 4571-4582.

Damen, W.G., Tautz, D., 1998. A Hox class 3 orthologue from the spider *Cupiennius salei* is expressed in a Hox-gene-like fashion. Dev Genes Evol 208, 586-590.

Davis, G.K., Patel, N.H., 2002. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. Annu Rev Entomol 47, 669-699.

de las Heras, J.M., Casanova, J., 2006. Spatially distinct downregulation of Capicua repression and tailless activation by the Torso RTK pathway in the *Drosophila* embryo. Mech Dev 123, 481-486.

De Renzis, S., Elemento, O., Tavazoie, S., Wieschaus, E.F., 2007. Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the *Drosophila* embryo. PLoS Biol 5, e117.

Dearden, P., Akam, M., 1999. Developmental evolution: Axial patterning in insects. Curr Biol 9, R591-594.

Driever, W., Nusslein-Volhard, C., 1988a. The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. Cell 54, 95-104.

Driever, W., Nusslein-Volhard, C., 1988b. A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. Cell 54, 83-93.

Ephrussi, A., Dickinson, L.K., Lehmann, R., 1991. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant *nanos*. Cell 66, 37-50.

Ewen-Campen, B., Shaner, N., Panfilio, K.A., Suzuki, Y., Roth, S., Extavour, C.G., 2011. The maternal and early embryonic transcriptome of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. BMC Genomics 12, 61.

Extavour, C.G., 2011. Long-lost relative claims orphan gene: oskar in a wasp. PLoS Genet 7, e1002045.

Finkelstein, R., Boncinelli, E., 1994. From fly head to mammalian forebrain: the story of otd and Otx. Trends Genet 10, 310-315.

Foe, V.E., Alberts, B.M., 1983. Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* 61, 31-70.

Fonseca, R.N., Lynch, J.A., Roth, S., 2009. Evolution of axis formation: mRNA localization, regulatory circuits and posterior specification in non-model arthropods. *Curr Opin Genet Dev* 19, 404-411.

Fontenele, M., Carneiro, K., Agrellos, R., Oliveira, D., Oliveira-Silva, A., Vieira, V., Negreiros, E., Machado, E., Araujo, H., 2009. The Ca²⁺-dependent protease Calpain A regulates Cactus/I kappaB levels during *Drosophila* development in response to maternal Dpp signals. *Mech Dev* 126, 737-751.

Goltsev, Y., Hsiong, W., Lanzaro, G., Levine, M., 2004. Different combinations of gap repressors for common stripes in *Anopheles* and *Drosophila* embryos. *Dev Biol* 275, 435-446.

Goltsev, Y., Rezende, G.L., Vranizan, K., Lanzaro, G., Valle, D., Levine, M., 2009. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev Biol* 330, 462-470.

Grimaldi, D., Engel, M.S., 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.

Harris, R.E., Ashe, H.L., 2011. Cease and desist: modulating short-range Dpp signalling in the stem-cell niche. *EMBO Rep* 12, 519-526.

Harris, R.E., Pargett, M., Sutcliffe, C., Umulis, D., Ashe, H.L., 2011. Brat promotes stem cell differentiation via control of a bistable switch that restricts BMP signaling. *Dev Cell* 20, 72-83.

Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2009. NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000232.

Hinton, H.E., 1981. *Biology of insect eggs*. Pergamon Press.

Ho, K., Dunin-Borkowski, O.M., Akam, M., 1997. Cellularization in locust embryos occurs before blastoderm formation. *Development* 124, 2761-2768.

Hughes, C.L., Kaufman, T.C., 2002. Exploring the myriapod body plan: expression patterns of the ten Hox genes in a centipede. *Development* 129, 1225-1238.

Jaeger, J., 2011. The gap gene network. *Cell Mol Life Sci* 68, 243-274.

Jiang, J., Rushlow, C.A., Zhou, Q., Small, S., Levine, M., 1992. Individual dorsal morphogen binding sites mediate activation and repression in the *Drosophila* embryo. *Embo J* 11, 3147-3154.

Juhn, J., James, A.A., 2006. oskar gene expression in the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 15, 363-372.

Kanayama, M., Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2010. Early embryonic development in the spider *Achaearanea tepidariorum*: Microinjection verifies that cellularization is complete before the blastoderm stage. *Arthropod Struct Dev* 39, 436-445.

Kobayashi, S., Yamada, M., Asaoka, M., Kitamura, T., 1996. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature* 380, 708-711.

Little, S.C., Tkacik, G., Kneeland, T.B., Wieschaus, E.F., Gregor, T., 2011. The formation of the Bicoid morphogen gradient requires protein movement from anteriorly localized mRNA. *PLoS Biol* 9, e1000596.

Lu, X., Li, J.M., Elemento, O., Tavazoie, S., Wieschaus, E.F., 2009. Coupling of zygotic transcription to mitotic control at the *Drosophila* mid-blastula transition. *Development* 136, 2101-2110.

Lynch, J.A., Olesnick, E.C., Desplan, C., 2006. Regulation and function of tailless in the long germ wasp *Nasonia vitripennis*. *Dev Genes Evol* 216, 493-498.

Lynch, J.A., Ozuak, O., Khila, A., Abouheif, E., Desplan, C., Roth, S., 2011. The phylogenetic origin of *oskar* coincided with the origin of maternally provisioned germ plasm and pole cells at the base of the Holometabola. *PLoS Genet* 7, e1002029.

Lynch, J.A., Peel, A.D., Drechsler, A., Averof, M., Roth, S., 2010. EGF signaling and the origin of axial polarity among the insects. *Curr Biol* 20, 1042-1047.

Lynch, J.A., Roth, S., 2011. The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects. *Genes Dev* 25, 107-118.

McMahon, A., Supatto, W., Fraser, S.E., Stathopoulos, A., 2008. Dynamic analyses of *Drosophila* gastrulation provide insights into collective cell migration. *Science* 322, 1546-1550.

Monnerat, A.T., Machado, M.P., Vale, B.S., Soares, M.J., Lima, J.B., Lenzi, H.L., Valle, D., 2002. *Anopheles albitarsis* embryogenesis: morphological identification of major events. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 589-596.

Moussian, B., Roth, S., 2005. Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo--shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr Biol* 15, R887-899.

Murakami, R., Okumura, T., Uchiyama, H., 2005. GATA factors as key regulatory molecules in the development of *Drosophila* endoderm. *Dev Growth Differ* 16, 581-589.

Negreiros, E., Fontenele, M., Camara, A.R., Araujo, H., 2010. α PS1 β PS integrin receptors regulate the differential distribution of Sog fragments in polarized epithelia. *Genesis* 48, 31-43.

Nunes da Fonseca, R., Lynch, J., Roth, S., 2009. Evolution of axis formation: mRNA localization, regulatory circuits and posterior specification in non-model arthropods. *Curr Opin Genet Dev* 19:(4); 404-11.

Nunes da Fonseca, R., von Levetzow, C., Kalscheuer, P., Basal, A., van der Zee, M., Roth, S., 2008. Self-regulatory circuits in dorsoventral axis formation of the short-germ beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Cell* 14, 605-615.

Oda, H., Akiyama-Oda, Y., 2008. Differing strategies for forming the arthropod body plan: lessons from Dpp, Sog and Delta in the fly *Drosophila* and spider *Achaearanea*. *Dev Growth Differ* 50, 203-214.

Oda, H., Nishimura, O., Hirao, Y., Tarui, H., Agata, K., Akiyama-Oda, Y., 2007. Progressive activation of Delta-Notch signaling from around the blastopore is required to set up a functional caudal lobe in the spider *Achaearanea tepidariorum*. *Development* 134, 2195-2205.

Olesnick, E.C., Brent, A.E., Tonnes, L., Walker, M., Pultz, M.A., Leaf, D., Desplan, C., 2006. A caudal mRNA gradient controls posterior development in the wasp *Nasonia*. *Development* 133, 3973-3982.

Ozhan-Kizil, G., Havemann, J., Gerberding, M., 2009. Germ cells in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* depend on Vasa protein for their maintenance but not for their formation. *Dev Biol* 327, 230-239.

Panfilio, K.A., 2008. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Dev Biol* 313, 471-491.

Panfilio, K.A., 2009. Late extraembryonic morphogenesis and its zen(RNAi)-induced failure in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Dev Biol* 333, 297-311.

Panfilio, K.A., Liu, P.Z., Akam, M., Kaufman, T.C., 2006. *Oncopeltus fasciatus* zen is essential for serosal tissue function in katatrepsis. *Dev Biol* 292, 226-243.

Panfilio, K.A., Roth, S., 2010. Epithelial reorganization events during late extraembryonic development in a hemimetabolous insect. *Dev Biol* 340, 100-115.

Papathanos, P.A., Windbichler, N., Menichelli, M., Burt, A., Crisanti, A., 2009. The vasa regulatory region mediates germline expression and maternal transmission of proteins in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: a versatile tool for genetic control strategies. *BMC Mol Biol* 10, 65.

Papatsenko, D., Levine, M., Goltsev, Y., 2011. Clusters of temporal discordances reveal distinct embryonic patterning mechanisms in *Drosophila* and *Anopheles*. PLoS Biol 9, e1000584.

Reuter, R., 1994. The gene *serpent* has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. Development 120, 1123-1135.

Roth, S., 2004. Gastrulation in other insects, in: Stern, C. (Ed.), Gastrulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 105-121.

Roth, S., Lynch, J.A., 2009. Symmetry breaking during *Drosophila* oogenesis. Cold Spring Harb Perspect Biol 1, a001891.

Saito, K.C., Bechara, G.H., Nunes, E.T., de Oliveira, P.R., Denardi, S.E., Mathias, M.I., 2005. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Vet Parasitol 129, 299-311.

Sample, C., Shvartsman, S.Y., 2010. Multiscale modeling of diffusion in the early *Drosophila* embryo. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 10092-10096.

Sander, K., 1971. Pattern formation in longitudinal halves of leaf hopper eggs (Homoptera) and some remarks on the definition of "embryonic regulation". Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org. 167, 336-352.

Sander, K., 1976. Specification of the basic body pattern in insect embryogenesis. Adv Insect Physiol 12, 125-238.

Sandmann, T., Girardot, C., Brehme, M., Tongprasit, W., Stolc, V., Furlong, E.E., 2007. A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*. Genes Dev 21, 436-449.

Santos, I.K., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., de Castro, M., Costa, J.N., Costa, A.M., da Silva, E.R., Neto, O.B., Rocha, C., Daffre, S., Ferreira, B.R., da Silva, J.S., Szabo, M.P., Bechara, G.H., 2004. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. Ann N Y Acad Sci 1026, 242-246.

Schoppmeier, M., Schroder, R., 2005. Maternal torso signaling controls body axis elongation in a short germ insect. Curr Biol 15, 2131-2136.

Schroder, R., 2003. The genes *orthodenticle* and *hunchback* substitute for bicoid in the beetle *Tribolium*. Nature 422, 621-625.

Schroder, R., Eckert, C., Wolff, C., Tautz, D., 2000. Conserved and divergent aspects of terminal patterning in the beetle *Tribolium castaneum*. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6591-6596.

Schulz, C., Tautz, D., 1995. Zygotic caudal regulation by hunchback and its role in abdominal segment formation of the *Drosophila* embryo. *Development* 121, 1023-1028.

Semotok, J.L., Lipshitz, H.D., 2007. Regulation and function of maternal mRNA destabilization during early *Drosophila* development. *Differentiation* 75, 482-506.

Simpson-Brose, M., Treisman, J., Desplan, C., 1994. Synergy between the hunchback and bicoid morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*. *Cell* 78, 855-865.

Small, S., Blair, A., Levine, M., 1992. Regulation of even-skipped stripe 2 in the *Drosophila* embryo. *Embo J* 11, 4047-4057.

St Johnston, D., Nusslein-Volhard, C., 1992. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68, 201-219.

Stathopoulos, A., Levine, M., 2005. Genomic regulatory networks and animal development. *Dev Cell* 9, 449-462.

Stauber, M., Jackle, H., Schmidt-Ott, U., 1999. The anterior determinant *bicoid* of *Drosophila* is a derived Hox class 3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3786-3789.

Stauber, M., Prell, A., Schmidt-Ott, U., 2002. A single *Hox3* gene with composite *bicoid* and *zerknüllt* expression characteristics in non-Cyclorrhaphan flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 274-279.

Stollewerk, A., Schoppmeier, M., Damen, W.G., 2003. Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation. *Nature* 423, 863-865.

Struhl, G., Struhl, K., Macdonald, P.M., 1989. The gradient morphogen *bicoid* is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell* 57, 1259-1273.

Tadros, W., Westwood, J.T., Lipshitz, H.D., 2007. The mother-to-child transition. *Dev Cell* 12, 847-849.

van der Zee, M., Berns, N., Roth, S., 2005. Distinct functions of the *Tribolium* *zerknüllt* genes in serosa specification and dorsal closure. *Curr Biol* 15, 624-636.

Veraksa, A., Del Campo, M., McGinnis, W., 2000. Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol Genet Metab* 69, 85-100.

Walker, J.J., Lee, K.K., Desai, R.N., Erickson, J.W., 2000. The *Drosophila melanogaster* sex determination gene *sisA* is required in yolk nuclei for midgut formation. *Genetics* 155, 191-202.

Wang, Z., Lin, H., 2004. Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. *Science* 303, 2016-2019.

Zeitlinger, J., Zinzen, R.P., Stark, A., Kellis, M., Zhang, H., Young, R.A., Levine, M., 2007. Whole-genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist, and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 21, 385-390.

Zimyanin, V.L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M.J., Clark, A., Davis, I., St Johnston, D., 2008. In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* 134, 843-853.