

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

**Conflito sexual: por que machos e fêmeas de *Heliconius erato phyllis*
apresentam assincronia no início da reprodução?**

Thiana Alissa Arisi

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, para a obtenção
do título de Mestre em Genética
e Biologia Molecular

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Porto Alegre, março de 2016

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Ecológica do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil e no Laboratório de Fisiologia da Conservação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre. A mestranda obteve bolsa de estudos do CNPq (24 meses).

Aos meus pais, Izolete e Odolir

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Aldo pela orientação, suporte (até mesmo financeiro), compreensão e paciência durante todo esse período; também, por sempre me integrar as rodas de chimarrão mesmo eu não bebendo. Aos colegas de laboratório pela boa convivência, em especial à Janaína por aguentar minha falta de entusiasmo para fotos, pelos conselhos e assistência e principalmente pelos brigadeiros de micro-ondas.

A professora Guendalina Turcato Oliveira por me receber tão bem em seu laboratório e aceitar colaborar de forma tão importante neste trabalho. Aos alunos do Laboratório de Fisiologia da Conservação-PUCRS por serem amigáveis e me ajudarem durante as análises.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS por todo o suporte técnico e financeiro e também pela oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço às colegas de mestrado Camila e Luiza pelos almoços, conversas e por tantos momentos de descontração.

Por fim, agradeço aos meus pais por sempre me incentivarem e apoiarem nos estudos e por compreender as curtas visitas.

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	6
Capítulo 1: Introdução Geral	7
1.2 Objetivos.....	11
Capítulo 2: Conflito sexual: por que machos e fêmeas de <i>Heliconius erato phyllis</i> apresentam assincronia no início da reprodução?	13
2.1 Introdução.....	14
2.2 Materiais e métodos.....	15
2.3 Resultados.....	18
2.4 Discussão.....	21
2.5 Referências Bibliográficas.....	24
Capítulo 3: Considerações Finais	34
Referências Bibliográficas	36

RESUMO

Heliconius erato phyllis (Lepidoptera, Nymphalidae) faz parte do grupo de borboletas Neotropicais, aposemáticas impalatáveis do gênero *Heliconius*. Essa espécie apresenta assincronia no amadurecimento sexual entre machos e fêmeas. Enquanto as fêmeas já estão aptas a copular após emergirem, os machos não apresentam habilidade para copular antes de 6 a 7 dias. O objetivo do estudo foi investigar as causas dessa assincronia no amadurecimento sexual entre machos e fêmeas utilizando uma abordagem fisiológica. Foram analisadas as diferenças sexuais, por métodos de espectrofotometria, as variáveis metabólicas glicogênio, lipídios totais, triglicerídeos, proteínas totais, ácido úrico, lactato, lipo peroxidação e a atividade enzimática da catalase e glutathione s-transferase durante a metamorfose e na vida adulta antes e depois da reprodução. Durante a metamorfose o glicogênio parece ser o principal substrato utilizado no desenvolvimento. As enzimas antioxidantes se mantiveram mais altas nas pupas do que nos adultos indicando que possuem um papel importante durante a metamorfose. Encontrou-se diferenças sexuais, principalmente nos adultos, quanto a mobilização dos recursos energéticos. Machos mantem os níveis de lipídios mais altos do que as em fêmeas durante a vida adulta e de glicogênio nos primeiros dias. Esses resultados sugerem que talvez a assincronia sexual em termos do início de reprodução, em *H. erato phyllis*, seja uma questão de capacidade energética para os machos.

ABSTRACT

The butterfly *Heliconius erato phyllis* is part of the group of Neotropical butterflies which are unpalatable and aposematic. This species has an asynchrony in sexual maturity between males and females. While females are already able to copulate after emerging, males have no ability to copulate before 6 to 7 days. The objective of this study was to investigate the causes of this asynchrony in sexual maturity between males and females using a physiological approach. We analyzed, by spectrophotometry methods, the metabolic variables glycogen, total lipids, triglycerides, total proteins, uric acid, lactate, lipo peroxidation and enzymatic activity of catalase and glutathione s-transferase in both sexes during metamorphosis and adult life before and after copulation. During metamorphosis glycogen appears to be the main substrate used in the development. Antioxidant enzymes remained higher in pupae than in adults indicating that they play an important role during metamorphosis. We found sexual differences, especially in adults, on the mobilization of energy resources. Males maintain lipid levels higher than in females during adulthood and glycogen in the early days. These results suggest that perhaps the sexual asynchrony *H. erato phyllis* is a matter of energetic capacity for males.

Capítulo 1

Introdução Geral

A biologia evolutiva tem tratado, tanto teoricamente como empiricamente a questão da evolução das histórias de vida e *trade-offs* (uma expressão comumente usada em inglês, pois sua tradução implica em explicar a alocação de recursos para diferentes funções, tal como sobrevivência e reprodução, por exemplo; o aumento de uma implica necessariamente, na diminuição da outra). O problema básico é como distribuir os recursos energéticos entre a duração da vida, sobrevivência e atividade reprodutiva. Qual o ganho em começar a reproduzir cedo na vida? Isso implicaria em uma duração da vida mais curta? (Roff, 1992; Herron e Freeman, 2014).

Há uma grande variação nas histórias de vidas entre as espécies e em particular entre as borboletas. No Rio Grande do Sul há espécies que representam exemplos extremos de histórias de vida: de um lado, espécies do gênero *Actinote* (Fig. 1. Nymphalidae, Acraeinae), abundantes em todo o Estado, fazem uma postura única, com mais de 150 ovos (semelparidade), mas seu período de vida adulta é de 7 a 10 dias, em média. Já as espécies de *Heliconius* (Fig. 2. Nymphalidae, Heliconiinae) cuja vida na fase adulta pode durar até 6 meses (em cativeiro uma fêmea chegou aos 8 meses), apresentam reprodução contínua durante toda a vida, com postura de ovos diária entre 3 a 4 ovos (iteroparidade). Todavia, mesmo dentro do gênero *Heliconius* há diferenças nas histórias de vida; apenas para exemplificar, uma espécie que é da Mata Atlântica, *Heliconius sara apseudes*, que é também de vida longa, só que as fêmeas colocam ovos junto de posturas prévias, tal que uma “postura” pode ter cerca de 50 – 70 ovos, mas de fêmeas diferentes. As espécies mais comuns no RS, *H.erato phyllis*, *H. besckei* e *H.ethilla narcaea*, todas colocam ovos individuais, durante meses.



Fig. 1. *Actinote surima*, Tainhas, RS.



Fig. 2. *Heliconius erato phyllis*, Itapuã, RS.

Em muitas espécies de animais, machos e fêmeas diferem morfologicamente e também em seus comportamentos reprodutivos, podendo assim, em resposta aos mesmos estímulos ambientais adotarem diferentes estratégias comportamentais e fisiológicas. Como exemplo podemos citar o experimento de Leimar *et al* (1994) com a borboleta *Pieris napi*, onde fêmeas e machos responderam de maneira diferente à falta de alimento, com as fêmeas respondendo mais fortemente do que os machos na direção da diminuição do tempo de desenvolvimento e redução corporal.

A relação do organismo com o seu ambiente é mediada por uma base fisiológica. Existem vários mecanismos fisiológicos que podem levar a trade-offs, logo a fisiologia desempenha um papel na mediação das histórias de vida. Componentes importantes de

histórias de vida, como as proteínas (utilizada na produção de ovos), triglicerídeos e glicogênio para funções somáticas (energia para o crescimento e manutenção) e também reprodutivas (síntese de vitelo) e enzimas antioxidantes que ajudam a manter o balanço redox, combatendo o estresse oxidativo, são produtos de vias metabólicas específicas. Uma profunda compreensão sobre as modificações bioquímicas e moleculares de vias específicas do metabolismo que produzem componentes moleculares das histórias de vida são importantes para um melhor entendimento das causas de história de vida e *trade-offs* (Zera e Harshman, 2011). Portanto, é aceito que entender os mecanismos fisiológicos que podem funcionar como restrições são importantes para a compreensão da diversificação das histórias de vida (Zera e Harshman 2001; Ricklefs e Wikelski 2002; Constantini 2014).

Borboletas tem sido um material utilizado amplamente em estudos evolutivos, como evolução e desenvolvimento (Aymone et al. 2013; 2014) mimetismo (Pardo-Diaz e Jiggins 2014), histórias de vida (Bear e Monteiro 2013) dentre outras abordagens. *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) tem ampla distribuição no Brasil fazendo parte do grupo de borboletas aposemáticas e impalatáveis da região Neotropical (Brown, 1981; Holzinger & Holzinger, 1994). Além do nectar essas borboletas se alimentam de pólen, o que desempenha um papel importante na reprodução e longevidade das fêmeas e machos (Gilbert, 1972). Nessa espécie as fêmeas copulam apenas uma vez durante a vida enquanto os machos podem copular varias vezes.

Um dos traços marcantes de *H. erato phyllis* é a assincronia no amadurecimento sexual entre machos e fêmeas: estas, quando emergem da pupa, já estão aptas a copular e frequentemente o fazem nas primeiras horas, ou, como é característico desta espécie, ocorre o *cruzamento pupal*. Neste caso, enquanto a borboleta está emergindo da pupa, algum macho irá acoplar-se (a Fig. 3 p.ex., mostra um agregado de machos aguardando

o início da eclosão de uma fêmea). Os machos, por sua vez, não apresentam habilidade para copular antes de 6 a 7 dias.



Fig. 3. Machos de *Heliconius erato phyllis* em atitude de interferência entre si, junto à pupa fêmea; um dos machos está em voo do tipo “hovering”, de acordo com a descrição do comportamento de corte (Klein e Araújo, 2010).

1.2 OBJETIVOS

Com base no exposto acima o objetivo geral do presente estudo foi investigar as causas da assincronia no amadurecimento sexual entre machos e fêmeas. Esse objetivo foi estruturado de acordo com as seguintes perguntas:

- (1) Os machos não tem capacidade fisiológica para a cópula ou trata-se de fenômeno comportamental que exige algum aprendizado?
- (2) Quais recursos energéticos são mobilizados para atingir a maturidade sexual?
- (3) Como se comportam, sob o enfoque fisiológico, as fêmeas, no que diz respeito à demandas energéticas e outras?

Capítulo 2

Conflito sexual: por que machos e fêmeas de *Heliconius erato phyllis* apresentam assincronia no início da reprodução?

2.1 INTRODUÇÃO

A teoria das história de vida assume que características e funções competem por recursos limitados, resultando em *trade-offs*. Por exemplo, se um indivíduo investe mais em crescimento ou reprodução, menos recursos são deixados para mecanismos de manutenção e reparo, dando origem a *trade-offs* entre estas características e longevidade (Stearns 1976).

Muitos modelos de história de vida têm explorado aspectos dinâmicos de alocação de recursos, estresse oxidativo e custo do desenvolvimento (Ellers e van Alphen, 1997; Zera e Cisper, 2001; Salomons, 2009). Em insetos holometábolos a alocação das reservas é um processo de três estágios correspondentes à fase do ciclo de vida. Nutrientes maternos e larvais são alocados durante a fase larval para o crescimento, manutenção, armazenamento, forrageamento, e às vezes reprodutivos. Durante a fase de pupa, os recursos disponíveis são re-allocados dentro deste sistema para diferentes partes do adulto (manutenção, armazenamento e estruturas reprodutivas). Na fase adulta, a entrada de nutrientes, juntamente com reservas larvais derivadas e, ocasionalmente, do estágio pupal é então alocado às características da história de vida e de forrageamento, que estão integradas e determinam a aptidão (Boggs, 2009).

O estudo de alimentação por radiomarcagem realizado por Boggs (1997) exemplifica esse processo. Este estudo investigou a utilização relativa de nutrientes pelas lagartas e pelos adultos na reprodução em borboletas em função da história de vida e alimentação onde, tanto os nutrientes derivados das lagartas quanto dos adultos participam da reprodução. A relação entre o tempo de aquisição de nutrientes e a utilização de reservas de energia para a reprodução também tem implicações importantes para a identificação das causas ecológicas de *trade-offs*.

Estudos fisiológicos têm sido utilizados para esclarecer mecanismos da evolução das histórias de vida através da identificação de interações funcionais entre os vários componentes que caracterizam histórias de vida (Stevens *et al.* 1999, Isaksson *et al.*, 2011).

As borboletas neotropicais *Heliconius* têm sido amplamente usadas em pesquisas de evolução e ecologia, dentre outros (p.ex., Aymone *et al.* 2013; Pardo-Diaz e Jiggins 2014). *Heliconis erato phyllis* apresenta uma interessante estratégia de vida relacionada à reprodução, machos e fêmeas apresentam uma assincronia no amadurecimento sexual. Quando emergem das pupas as fêmeas já estão aptas a copular. Os machos, por sua vez, não apresentam habilidade para copular antes de seis a sete dias. Uma vez que estratégias de vida podem em parte estar correlacionada com a fisiologia destes animais, comparar as diferenças sexuais em tais características durante o ciclo de vida poderiam fornecer *insights* sobre as causas de tais diferenças nestes insetos.

O presente estudo teve como objetivo analisar em machos e fêmeas a mobilizações de diferentes metabolitos durante a metamorfose e a vida adulta de *H. erato phyllis* visando entender a assincronia no amadurecimento sexual apresentada pelos sexos; bem como suas relações com o balanço redox.

2.2 METODOLOGIA

Os níveis de glicogênio, lipídios totais, triglicerídeos, proteínas totais, ácido úrico, lactato, lipoperoxidação, além da atividade das enzimas de catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), foram analisados entre os sexos durante a metamorfose, nos tempos de 24, 72, 120 e 168 horas, em adultos virgens, após emergirem e com 48h, e após a cópula.

Coleta e criação:

Os animais utilizados nos experimentos vieram da criação em laboratório do Departamento de Genética, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, provenientes de fêmeas que foram coletadas de populações naturais nas proximidades da cidade de Porto Alegre. Os animais foram mantidos em viveiros (2 x 3x 3 m³) em condições seminaturais contendo plantas hospedeiras, especialmente *Passiflora suberosa*. Diariamente foi fornecida alimentação, composta de água, mel e pólen, em alimentadores artificiais (Tabela1). Os ovos foram coletados diariamente e as lagartas mantidas em laboratório a uma temperatura controlada (25°± 5° C), com uma dieta diária de *Passiflora suberosa*.

Os adultos após emergirem foram coletados após a extensão completa das asas ainda no laboratório. Os adultos dos grupos 48h e pós-cópula foram mantidos em viveiros até o momento da coleta. Os machos utilizados nos experimentos para o grupo pós-cópula foram colocados em viveiros separados por sexo e após atingirem 7 dias uma fêmea (recem emergida) era oferecida, sendo ambos coletados logo após a cópula. As pupas foram coletadas no tempo determinado após serem sexadas (Beebe *et al*, 1960). Os animais coletados para as análises bioquímicas foram mantidos em ultrafreezer (-80°C).

Análises bioquímicas:

As análises bioquímicas foram realizadas através de espectrofotometria. *Pools* de três indivíduos foram utilizados. Para cada técnica dois *pools*, obtidos em dois cultivos independentes, foram utilizados por grupo (dois para glicogênio; dois para proteína total, ácido úrico, lactato, lipoperoxidação e atividade enzimática; dois *pools* para lipídios e triglicerídeos), exceto para os grupos adulto após emergirem e pós-

cópula onde apenas um *pool* por técnica, quando apenas três indivíduos foram utilizados. Cada metabólito foi determinado em quadruplicata.

O glicogênio foi extraído de acordo com Van Handel (1965) e quantificado como glicose após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (Na_2CO_3), utilizando kit comercial Labtest (Glucose PAP Liquiform). Lipídeos e triglicerídeos foram extraídos pelo método de clorofórmio: metanol (2: 1) (Folch *et al*, 1957). Os lipídios totais foram determinados pelo método de sulfo-fosfo-vanilina (Frings e Dunn, 1970), e os triglicerídeos através do kit comercial Labtest.

Para as análises de proteínas totais, ácido úrico, lactato, atividade das enzimas antioxidantes e lipoperoxidação foi realizado um homogeneizado em uma solução de tampão fosfato 20mM acrescido de PMSF 1mM. A concentração total de proteínas foi quantificada de acordo com o método descrito por Beyer (1983) com a albumina bovina como referência utilizando o kit comercial Proteína Total, Labtest. Os níveis de ácido úrico e de lactato foram determinados através de kits comerciais (Labtest e Doles). Os resultados das análises citadas acima foram expressos em miligramas por grama de animais.

A medição da lipoperoxidação foi realizada pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Foram adicionados a um tubo de ensaio: 150 uL de ácido tricloroacético a 10% (TCA), 50 uL de homogeneizado dos animais, 100 ul de ácido tiobarbitúrico a 0,67% (TBA), e 50 uL de água destilada. A mistura é aquecida á 100°C durante 15min. Depois de resfriada, adiciona-se 300µl de álcool n-butílico para extrair o produto corado da solução aquosa. Os tubos são agitados em vórtex e centrifugados durante 10 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi adicionado à

cubeta e lido no espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em microanomoles por miligrama de proteína (Buege e Aust 1978).

A atividade enzimática da catalase foi determinada medindo o decaimento de H₂O₂ a 240 nm (Boveris e Chance, 1973) o resultado foi expresso em picomoles por miligrama de proteína. A atividade da glutathione S-transferase foi medida de acordo com Boyland e Chasseaud (1969), medindo a conjugação de 1-cloro 2,4- dinitrobenzeno (CDNB) com a actividade de glutathione reduzida (GSH) como uma função de aumento dos valores de absorbância a 340 nm. Os resultados foram expressos em milimoles por miligrama de proteína.

Análise estatística:

Para avaliar se existiam diferenças nos níveis dos metabólitos entre os diferentes grupos foi feita uma análise de variância por ANOVA de duas vias (sexo e os diferentes tempos de desenvolvimento) seguido de teste Tukey e para as variáveis não paramétricas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn através do software SPSS 18.0, com nível de significância mínimo de $\alpha = 0,05$.

2.3 RESULTADOS

Proteínas Totais

A Fig. 1 mostra que os níveis de proteínas totais não apresentaram diferenças sexuais nos intervalos analisados. Os níveis de proteína de pupa 24h até adulto após emergir se mantêm parcialmente constantes. Ocorre um aumento acima de 200% de adultos após emergirem para adultos 48h ($p < 0,001$), na comparação entre adulto 48h e adulto pós-cópula há um decréscimo de metade dos níveis de proteínas totais ($p < 0,001$).

Ácido úrico

Os níveis de ácido úrico (Fig.2) tanto em machos quanto em fêmeas se mantiveram constantes nas pupas aumentando cerca de cinco vezes de pupas 168h para adultos machos após emergirem ($p=0,028$) e nas fêmeas para adultos 48h ($p=0,008$). Houve diferenças sexuais nos adultos 48h ($p=0,001$) e pós-copula ($p=0,021$) onde as fêmeas apresentam uma concentração de ácido úrico maior, quase o dobro, do que foi encontrado em machos.

Lactato

Os níveis de lactato (Fig. 3) se mantiveram relativamente constantes de pupa 24h até adultos após emergirem, havendo um aumento de adultos após emergirem para adultos 48h (fêmeas $p<0,001$; machos $p=0,004$) e um decréscimo de adultos 48h para adultos pós-cópula (fêmeas $p=0,001$; machos $p=0,001$). Não houve diferenças sexuais entre os grupos.

Glicogênio

Houve diferenças sexuais em adultos 48h onde nos machos os níveis de glicogênio foram 78% maiores que nas fêmeas ($p=0,001$) (Fig. 4). Em ambos os sexos o nível de glicogênio decresceu ao longo do desenvolvimento pupal sendo que em 168h atingem os níveis mais baixos em comparação às 24h ($p<0,001$). Nas fêmeas após a queda em 168h os níveis de glicogênio se mantêm sem alterações significativas em comparação às pupas 168h. Já em machos, os níveis se mantêm constantes até adultos 48h onde comparando com adultos após emergirem ocorre um aumento de 400% ($p=0,001$).

Lipídios

Houve diferenças sexuais nas pupas nos tempos: 24 ($p=0,005$) e 72 horas ($p=0,021$); e nos adultos 48h ($p=0,007$) e pós-cópula ($p=0,021$) sendo os níveis de lipídios maiores nos machos (Fig.5). Durante o desenvolvimento pupal os níveis de lipídios nas pupas se mantiveram até 120h decaindo em torno de 60% nas fêmeas ($p=0,024$) e 70% nos machos ($p=0,032$) em 168h em relação a 120h. Após emergirem os níveis de lipídios nas fêmeas sobem significativamente, onze vezes em relação à pupa 168h, ($p=0,009$) e se mantém sem diferenças significativas de adultos após emergirem até após a cópula. Já em machos, os níveis de lipídios aumentam gradativamente de adultos após emergirem até pós-cópula em comparação com pupas 168h ($p<0,001$).

Triglicerídeos

Os níveis de triglicerídeos (Fig. 6) apresentaram diferenças sexuais em pupas 120h ($p=0,027$), adultos 48h($p=0,008$) e pós-cópula ($p<0,001$) onde os machos apresentaram níveis maiores. Nas fêmeas os níveis de triglicerídeos decaem cerca de 70% em pupas de pupas 24h para 72h ($p<0,001$) e se mantem sem diferenças significativas até após a cópula. Em machos os níveis de triglicerídeos oscilam bastante. Ocorre uma queda de 65% de pupa 24h para 72h ($p=0,001$), um aumento de 140% de pupa 72h para 120h ($p=0,002$) e novamente uma queda de pupa 120h para 168h ($p=0,001$); após emergir há um aumento de adulto após emergir para adulto 48h ($p=0,002$) aumentando novamente de adultos 48h para adultos após a cópula ($p=0,002$).

Atividade da CAT

Não houve diferenças sexuais para a atividade da catalase (Fig. 7). Durante o desenvolvimento pupal a atividade desta enzima se mantém ligeiramente constante

havendo uma queda para ambos os sexos em adultos 48h em comparação a adultos após (fêmeas $p=0,010$; machos $p=0,018$).

Atividade da GST

Em adultos após a cópula a atividade de GST (Fig. 8) foi maior em fêmeas ($p=0,028$). Durante o desenvolvimento das fêmeas a atividade da GST aumenta em comparação a pupa 24h para pupas 120h ($p=0,014$) e decai cerca de pupas 168h para adultos 48h ($p<0,001$). Em machos há um aumento da atividade da GST durante o de pupas 24h para pupas 168h ($p<0,001$), decaindo cerca de 80% de pupa 168h para adultos 48h ($p<0,001$).

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (Fig. 9) apresentou diferença sexual em pupas 120h ($p=0,041$), onde as fêmeas apresentaram níveis mais altos que os machos, e adultos 48h ($p=0,034$) onde os machos foram mais altos ($p<0,05$). O nível de peroxidação lipídica nas fêmeas aumenta em pupa 120h comparando com 24h ($p=0,030$) e em adulto 48h decai cerca de 80% em comparação a 120h ($p=0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de peroxidação lipídica entre os machos.

2.4 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que existem diferenças sexuais em *H. erato phyllis*, principalmente na vida adulta, quanto à mobilização dos recursos energéticos e outros metabólitos.

Durante o desenvolvimento os níveis de proteínas mantiveram-se constantes ao longo da metamorfose aumentando rapidamente em adultos 48h. Este rápido aumento

esta relacionado à alimentação, visto que estes animais se alimentam de pólen que é rico em aminoácidos. Tanto em machos quanto nas fêmeas houve um declínio de 50% nos níveis de proteína após a cópula, mostrando que as proteínas tem um papel importante durante a reprodução. Nas fêmeas esse alto nível proteico pode estar relacionado com a oogênese, pois em *H. erato phyllis* os aminoácidos consumidos durante a fase adulta são repassados aos ovos (Gilbert, 1975; Dunlap-Pianka et al. 1977).

Os níveis de ácido úrico corroboram com as respostas observadas para os níveis proteicos sendo que o ácido úrico é um subproduto do metabolismo de proteínas; contudo, os valores observados para o ácido úrico diferem da literatura. Em *Manduca sexta* durante a fase de pupa o nível de ácido úrico diminui aumentando ao final do desenvolvimento. o nível mais baixo de ácido úrico é encontrado em adultos após emergirem relacionado com a excreção do mecônio (Levenbook et al, 1971). Já em *H. erato phyllis* mesmo após a excreção do mecônio os níveis de ácido úrico são maiores do que o encontrado durante a metamorfose. As fêmeas parecem apresentar um maior *turnover* proteico, visto que os níveis de ácido úrico são maiores que em machos, o que pode estar relacionado com a produção de ovos. Cabe ressaltar que o ácido úrico também atua como uma molécula antioxidante (Andrade et al. 2010) e que nos períodos analisados de vida adulta (pós emersão, 48h e pós-cópula) encontramos os maiores níveis de ácido úrico e os menores níveis de lipoperoxidação; assim, não podemos descartar que esteja ocorrendo um aumento da síntese desta molécula para que ela atue como um antioxidante prevenindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

O glicogênio foi o principal substrato energético utilizado durante o desenvolvimento pupal. Diferente de *Lucilia cuprina* (Diptera) onde os substratos energéticos mais utilizados durante o desenvolvimento são proteínas e gorduras sendo a contribuição de carboidrato pequena (Crompton e Birt, 1967). Estudos utilizando

tomografia computadorizada de alta resolução, realizados por Lowe e colaboradores (2013), durante o desenvolvimento pupal, na borboleta *Vanessa cardui* mostram que a maioria das modificações morfológicas ocorrem antes do sétimo dia (168h) de desenvolvimento. O período de desenvolvimento de *Vanessa cardui* neste experimento foi de 16 dias. Em *H. erato phyllis* o desenvolvimento dura em torno de 7 a 9 dias. Sendo assim, podemos inferir que o processo de transformação corporal em *H. erato phyllis* ocorre em questão de horas o que explica o alto consumo de glicogênio entre o período de 24 e 72 horas. Nos machos o glicogênio parece ser uma fonte energética importante para a reprodução, já que este polissacarídeo acumula-se durante os primeiros dias da vida adulta decaindo 70% após a cópula. Não verificamos um incremento dos níveis de lactato sugerindo assim, o uso preferencial de vias oxidativas para síntese de ATP mostrando que o oxigênio não é um limitante durante a metamorfose.

Os níveis de triglicerídeos e lipídios totais são consumidos no início e ao final do desenvolvimento pupal respectivamente. Após emergirem os níveis de lipídios aumentam talvez para serem utilizados como fonte energética durante as primeiras horas da vida adulta. Conteúdo lipídico em geral foi maior nos machos diferente do encontrado em *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera) onde a concentração de lipídios foi maior nas fêmeas (Chippendale, 1973), entretanto os nossos resultados são consistentes com os achados de Gilbert e Schneiderman (1961) na mariposa *Hyalophora cecropia* onde os níveis de lipídios durante o desenvolvimento pupal foram mais altos em machos e em Niemierko et al. (1956) onde os machos adultos de *Bombyx mori* (Lepidoptera) tinham níveis maiores de lipídios. O maior teor de lipídios observados nos machos parece estar relacionado com a atividade de voo (Gilbert e Schneiderman, 1961), onde

os machos buscam ativamente fêmeas virgens para reproduzirem. Já as fêmeas utilizariam suas reservas principalmente na produção de ovos (Arrese e Soulages,2010).

A atividade da catalase não apresentou diferenças significativas entre os tempos de desenvolvimento pupal decaindo em adultos; contudo, em GST as fêmeas apresentam um incremento gradual até 120h, coincidindo com o aumento da lipo peroxidação (TBARS) em 120h. O aumento da atividade de GST em machos nos tempos 72h e 168h pode estar relacionado ao consumo de glicogênio e gorduras. Este incremento das enzimas antioxidantes parece ser um mecanismo de proteção para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em momentos de incremento possivelmente, das vias oxidativas. Os insetos *Tenebrio molitor* (Coleoptera) e *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera) apresentaram padrão semelhante da atividade enzimática encontrada em *H. erato* onde a atividade de GST foi maior nas pupas (Kostaropoulos et al,1996, Jovanović-Galović *et al* 2004). Isto pode ser explicado pelo fato de que a metamorfose envolve processos complexos de histólise e histogênese dos tecidos, eventos altamente conservados e controlados. Podemos também sugerir que durante a histólise/histogênese possam ser liberados subprodutos que necessitem ser metabolizados. Dentro deste contexto, cabe destacar que as enzimas de detoxificação celular, que atuam em rotas de excreção de substâncias endo e xenobióticas protegendo as células contra toxicidade química e estresse (Hermes-Lima e Storey, 1993). Dentre as enzimas detoxificantes mais estudadas estão as glutatona S-transferases (GSTs), pertencentes a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutatona a várias moléculas endo e xenobióticas (Freitas et al. 2007).

Para ambos os sexos a reprodução se mostrou bastante custosa (energeticamente) já que há uma redução acima de 50% das reservas de proteína (para ambos os sexos) e de 70% de glicogênio nos machos após a cópula. Esses dois

substratos são importantes para a reprodução (Boogs, 1981; O'Brien, 2004). Isso explica o rápido aumento desses dois metabólitos em machos uma vez que recém-emergidos não apresentam reservas suficientes para a cópula já que o glicogênio foi bastante utilizado durante o desenvolvimento pupal. Sendo assim, talvez em parte a assincronia entre machos e fêmeas no início da reprodução se deva a uma falta de reservas energéticas suficientes para este evento mostrando que a alocação energética tem um papel importante nas histórias de vida de machos e fêmeas.

Mais análises ainda devem ser feitas para entendermos melhor as causas da assincronia em *H. erato phyllis* e quais as vantagens e possíveis *trade-offs* dessa estratégia de vida.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieril AA (2010) Consequências da produção de espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. Ver.Bras.Reprod.Anim., Belo Horizonte, v.34, n.2, pp. 79-85.

Arrese EL, Soulages JL (2010) Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation Annu Rev Entomol, 55: 207-225.

Aymone ACB, Valente VLS, Araújo AM (2013) Ultrastructure and morphogenesis of wing scales in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): what silvery/brownish surfaces can tell us about the development of color patterning? Arthropod Struct Dev, 42: 359-369.

Beebe W, Crane J, Fleming H (1960) A comparison of eggs, larvae and pupae in fourteen species of *Heliconiine* butterflies from Trinidad, W.I. Zoologica, New York 45:111-153.

Beyer RE (1983) A rapid biuret assay for protein of whole fatty tissues. Anal Biochem, 129: 483-485.

Boggs CL (1981) Nutritional and life-history determinants of resource allocation in holometabolous insects. *Am Nat*, 117: 692-709

Boggs CL (1997) Dynamics of reproductive allocation from juvenile and adult feeding: radiotracer studies. *Ecology*, 78:192-202.

Boggs CL (2009) Nutritional Ecology: Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Func Ecol*, 23:27-37

Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, 134(3):707-16.

Boyland E, Chasseaud LF (1969) The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 32:173-219.

Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52:302-310.

Chippendale GM (1973) Metabolic reserves of larvae and pupae of the Angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella*. *Insect Biochem*, 3:1-10.

Crompton M, Birt LM (1967). Changes in the amounts of carbohydrates, phosphagen, and related compounds during the metamorphosis of the blowfly, *Lucilia cuprina*. *J Insect Physiol*, 13: 1575–1592.

Dunlap-Pianka H, Boggs C L, Gilbert LE (1977) Ovarian dynamics in heliconiine butterflies: programmed senescence versus eternal youth. *Science*, 197: 487-490.

Ellers J, van Alphen JJM (1997) Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *J Evol Biol*, 10:771-785.

Freitas DRJ, Rosa RM, Moraes J, Campos E, Logullo C, Da Silva Vaz Jr I, Masuda A. (2007) Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption,

lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Comp Biochem Physiol A*, 146:688–694.

Frings CS, Dunn RT (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Am J Clin Pathol*, 53: 89-91.

Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A Simple method for isolation and purification of total lipids from Animal Tissues. *J Biol Chem*, 226(1): 497-509.

Gilbert LI, Schneiderman HA (1961) The content of juvenile hormone and lipid in Lepidoptera : sexual differences and developmental changes. *Gen Comp Endocrinol*, 1: 453-472.

Hermes-Lima M, Storey KB (1993) *In vitro* oxidative inactivation of glutathione S-transferase from a freeze tolerant reptile. *Mol Cell Biochem*, 124:149-158.

Isaksson C, While GM, Olosson M, Komdeur J, Wapstra E (2011) Oxidative stress physiology in relation to life history traits of a free-living vertebrate: the spotted snow skink, *Niveoscincus ocellatus*. *Integr Zool*, 6:140-149.

Jovanović-Galović A, Blagojević DP, Grubor-Lajsić G, Worland R, Spasić MB (2004) Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): Diapause and metamorphosis. *Arch Insect Biochem Physiol*, 55(2):79-89.

Kostaropoulos I, Mantzari AE, Papadopoulos AI (1996) Alterations of some glutathione S-transferase characteristics during the development of *Tenebrio molitor* (Insecta: Coleoptera). *Insect Biochem Mol Biol*, 26(8-9):963-969.

Levenbook L, Hutchins RFN, Bauer AC (1971) Uric acid and basic amino acids during metamorphosis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, with special reference to the meconium. *J Insect Physiol*, 17:1321-1331.

Lowe T, Garwood RJ, Simonsen TJ, Bradley RS, Withers PJ (2013) Metamorphosis revealed: time-lapse three dimensional imaging inside a living chrysalis. *J R Soc Interface* 10: 20130304.

Merkey AB, Wong CK, Hoshizaki DK, Gibbs AG (2011) Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*, 57: 1437-1445.

Niemierko S, Wlodauer P, Wojtczak AF (1956) Lipid and phosphorus metabolism during growth of the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Biol Exptl*, 17: 255-276.

O'Brien DM, Boggs CL, Fogel ML (2004). Making eggs from nectar: the role of life history and dietary carbon turnover in butterfly reproductive resource allocation. *Oikos* 105:279-291.

Pardo-Diaz C, Jiggins CD (2014) Neighbouring genes shaping a single adaptive mimetic trait. *Evol Dev*, 16(1): 3-12.

Stearns SC (1976). Life-history tactics: A review of the ideas. *Q Rev Biol*, 51:272-8

Stevens DJ, Hansell MH, Freel JA, Monaghan P (1999). Developmental trade-offs in caddis flies: increased investment in larval defense alters adult resource allocation. *Proc R Soc B*, 266:1049-54.

Van Handel E (1965) Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Anal Biochem*, 11: 256-265.

Zera AJ, Cisneros GL (2001). Genetic and diurnal variation in the juvenile hormone titer in a wing polymorphic cricket: implications for the evolution of life histories and dispersal. *Physiol. Biochem, Zool*, 74:293-306.

Ziegler R (1991) Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *J Comp Physiol B*, 161:125-31.

Tabela 1. Informações da dieta oferecida a *Heliconius erato phyllis*.

Pólen	8.62gr	Mel	170.06gr
Proteínas	1.59%	Açúcares totais	117,44%
Minerais	0,22%	Umidade	27,01%
Lipídios	0,20%	Sólidos	90,42%

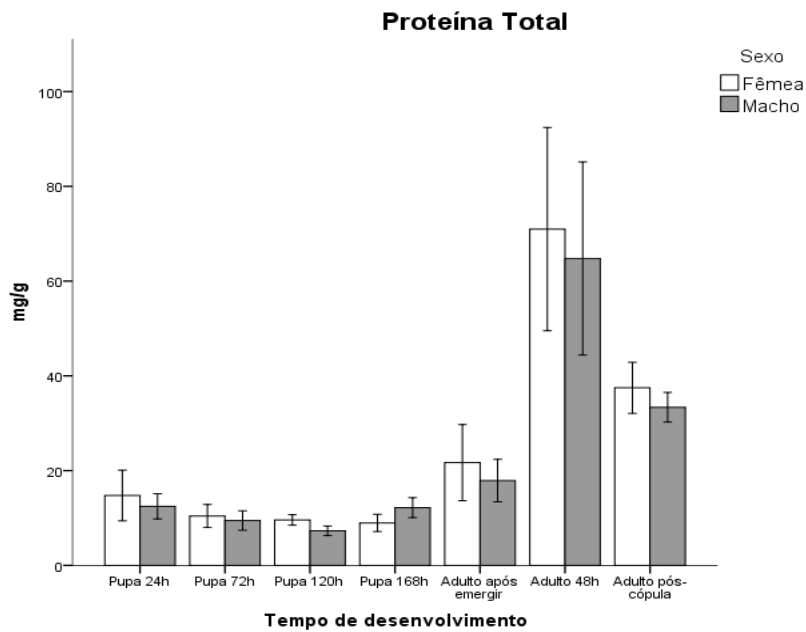


Fig. 1. Níveis de proteínas totais durante o desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*. As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média.

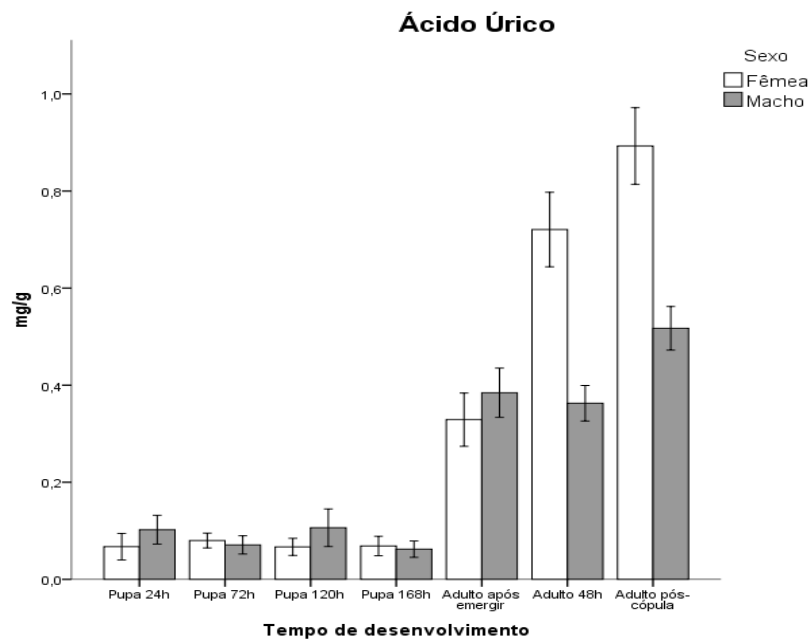


Fig. 2. Níveis de ácido úrico durante o desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*. As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média.

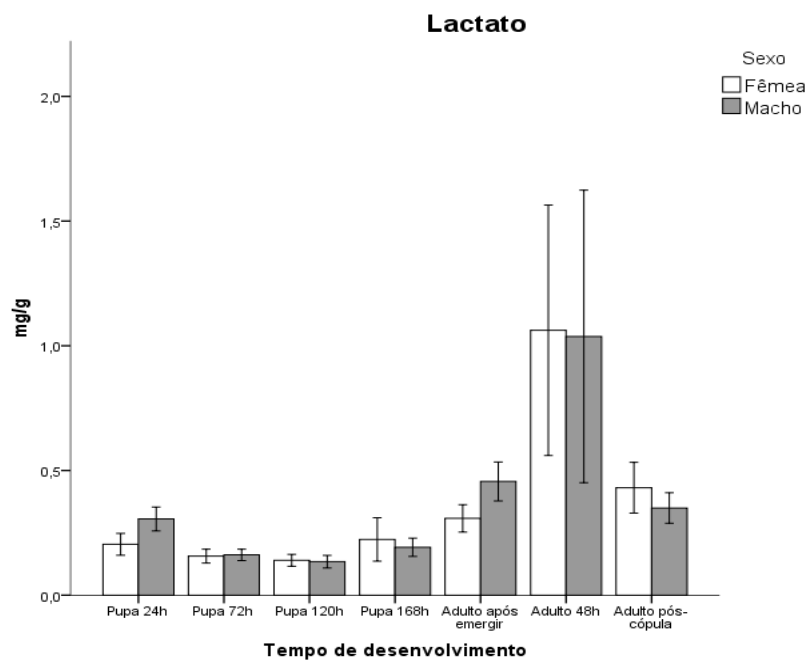


Fig. 3. Níveis de lactato durante o desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*. As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média.

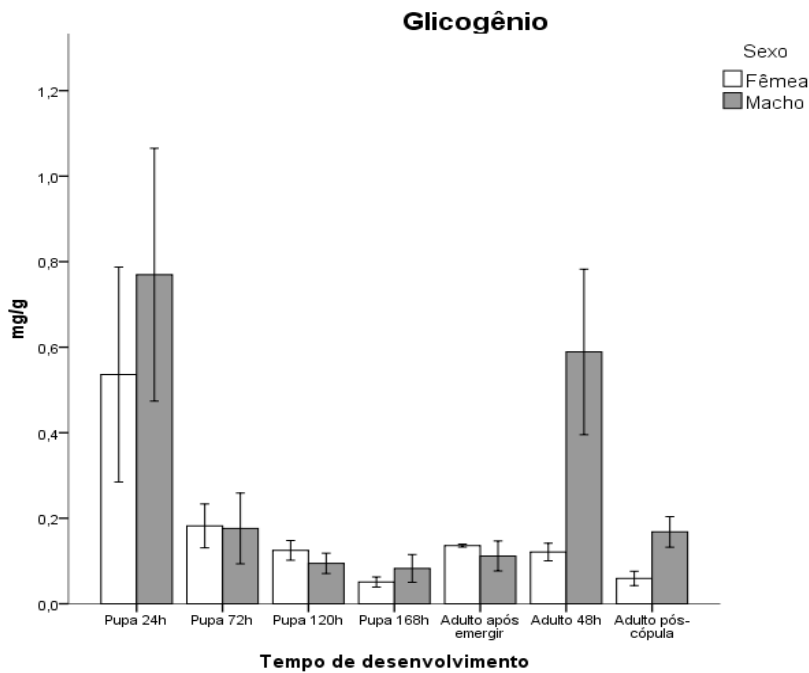


Fig. 4. Níveis de glicogênio durante o desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*. As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média.

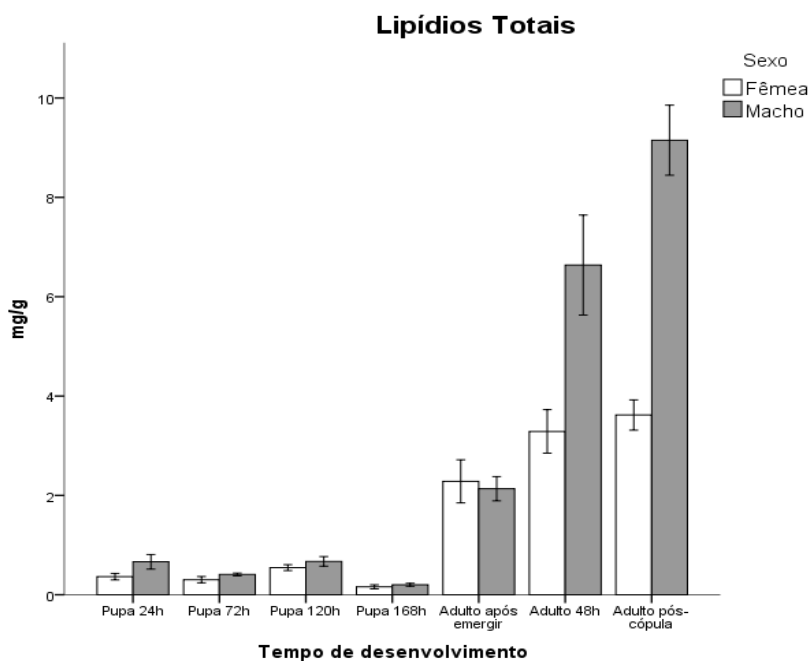


Fig. 5. Níveis de lipídios totais durante o desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*. As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média.

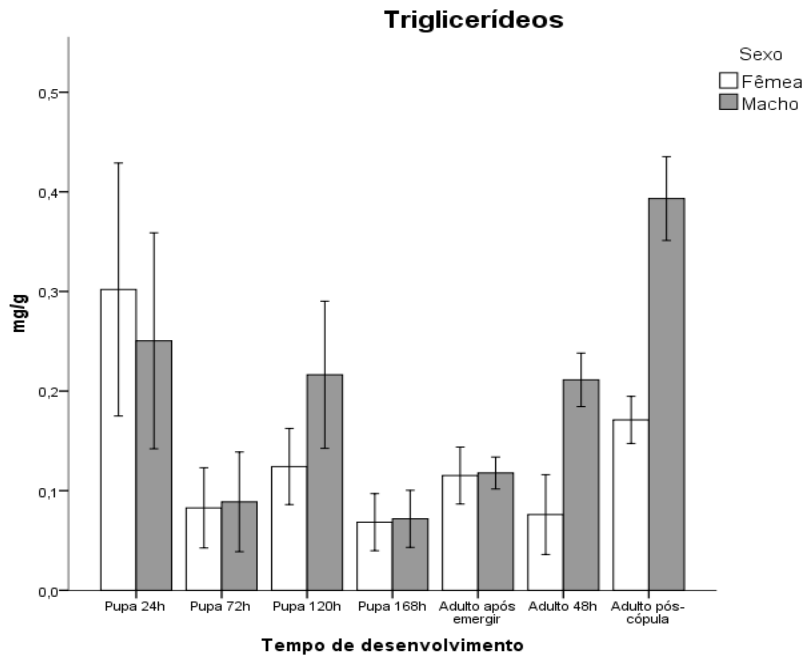


Fig. 6. Níveis de triglicerídeos durante o desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*. As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média.

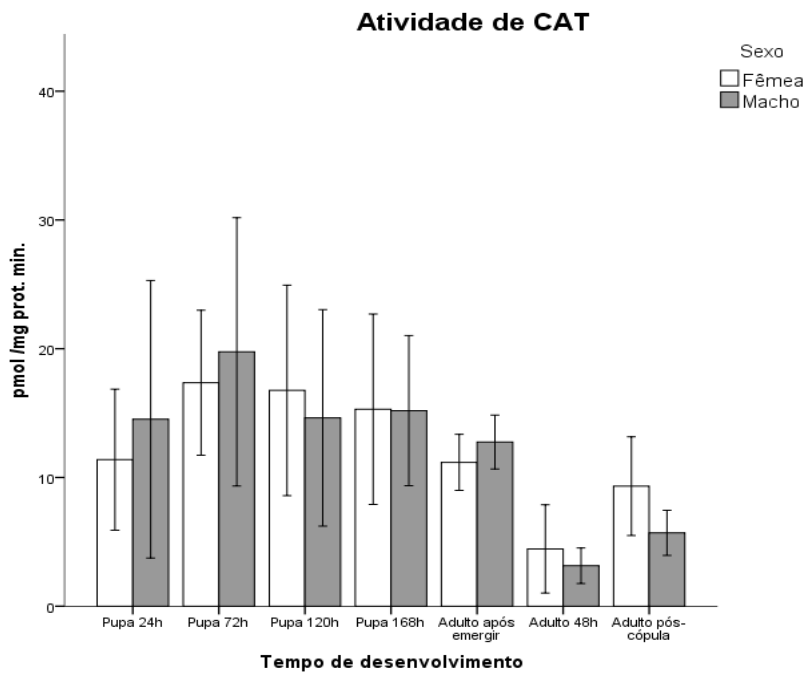


Fig. 8. Atividade de catalase durante o desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*. As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média.

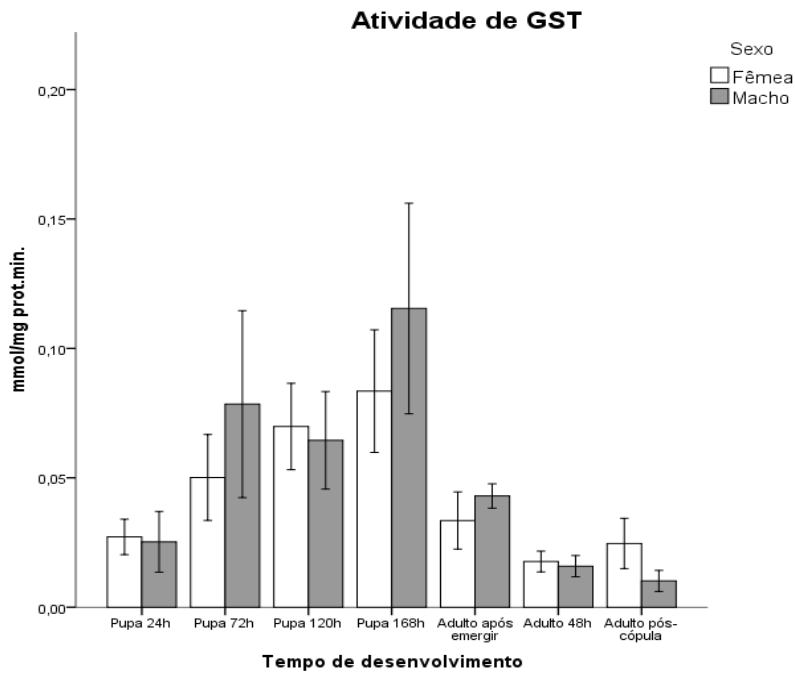


Fig. 9. Atividade de glutathione s-transferase durante o desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*. As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média.

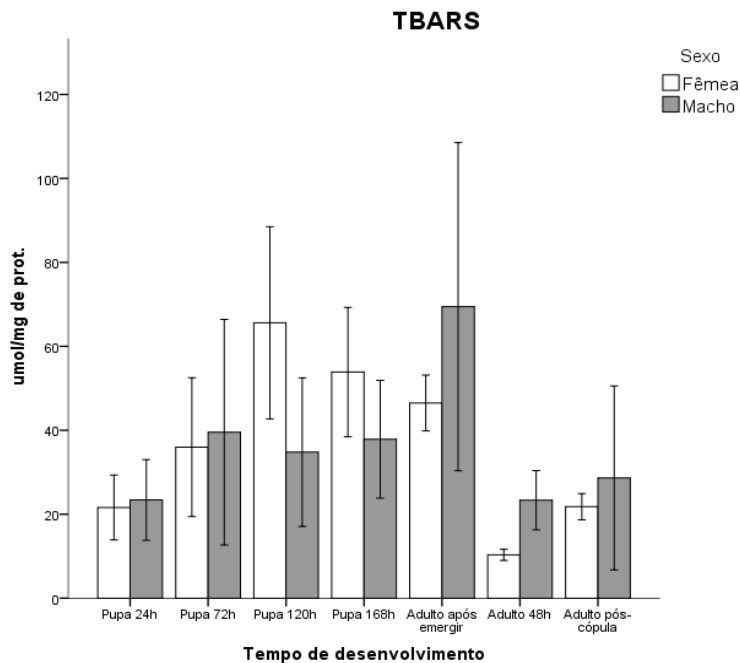


Fig.7. Níveis de peroxidação lipídica durante o desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*. As colunas representam a média e as barras verticais representam o erro padrão da média.

Capítulo 3

Considerações Finais

A presente dissertação visou contribuir para estudos sobre a biologia de *Heliconius erato phyllis*. Além disso, tentar explicar diferenças no processo de reprodução entre machos e fêmeas. Para tentar esclarecer essas diferenças utilizamos uma abordagem fisiológica durante diferentes estágios da vida de *H. erato phyllis*. Nossos resultados são os primeiros relatos sobre o metabolismo intermediário e o balanço redox durante a metamorfose, vida adulta e reprodução em *H. erato phyllis*. Estes resultados contribuirão para futuros estudos sobre a fisiologia e biologia destes animais.

Este estudo revelou aspectos da composição bioquímica apresentada por machos e fêmeas durante a metamorfose e vida adulta. Conseguimos notar diferentes estratégias entre os sexos quanto à mobilização destes metabolitos. Estas diferenças parecem estar relacionadas com a assincronia sexual na reprodução destas borboletas. Os machos parecem necessitar de tempo para acumular reservas energéticas suficientes para iniciarem a reprodução. O processo reprodutivo em *H. erato phyllis* se mostrou bastante custoso energeticamente. Isso nos leva a pensar sobre os possíveis *trade-offs* que a reprodução pode trazer a machos e fêmeas desta espécie e o quanto cada substrato energético influencia no processo reprodutivo.

Mais estudos sobre os diferentes mecanismos fisiológicos de machos e fêmeas e seus respectivos *trade-offs* devem ser realizados para um melhor entendimento das histórias de vida desses animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aymone ACB, Valente VLS, Araújo AM (2013) Ultrastructure and morphogenesis of wing scales in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): what silvery/brownish surfaces can tell us about the development of color patterning? *Arthropod Struct Dev*, 42: 359-369.

Aymone ACB, Lothammer N, Valente VLS, Araújo AM (2014) Embryogenesis of *Heliconius erato* (Lepidoptera; Nymphalidae): a contribution to the anatomical development of an evo-devo model organism. *Dev Growth Differ*, 56: 448-459.

Bear A, Montéiro A (2013) Male courtship rate plasticity in the butterfly *Bicyclus aninana* is controlled by temperature experienced during the pupal and adult stages. *Plos ONE*, 8(5):64-61.

Brown KS (1981) The Biology of *Heliconius* and Related Genera. *Annual Review of Entomology*, 26: 427- 457.

Costantini D (2014) Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology: A Marriage Between Mechanistic and Evolutionary Approaches. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.p.27-29.

Gilbert LE (1972) Pollen Feeding and Reproductive Biology of *Heliconius* Butterflies *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69: 1403-1407.

Holzinger H, Holzinger R (1994) *Heliconius* and related genera. *Sciences Naturelles*, 1-328.

Klein AL, Araujo AM (2010) Courtship behaviors of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals? *J Ethol*, 28:409-420.

Leimar O, Karlsson B, Wiklund (1994) Unpredictable food and sexual size dimorphism in insects. *Proc Biol Sci*, 258: 121-5.

Herron JC, Freeman S (2014) *Evolutionary Analysis*. Upper Saddle River, NJ :Pearson Prentice Hall. p. 491-529.

Pardo-Diaz C, Jiggins CD (2014) Neighbouring genes shaping a single adaptive mimetic trait. *Evol Dev*, 16(1): 3-12.

Ricklefs RE, Wikelski M (2002) The physiology/life-history nexus. *Trends Ecol Evol* 17:462-468.

Roff D (1992) *The Evolution of Life Histories: Theory and Analysis*. New York :Chapman & Ha. p. 535.

Zera JA, Harshman LG (2001) The Physiology of life history trade-offs in animals. *Annu Rev Ecol Syst*, 32:95-126.

Zera AJ, Harshman LG (2011) Intermediary metabolism and the biochemical-molecular basis of life history variation and trade-off in two insect models. In: *Mechanisms of Life History Evolution*. Published. New York, Oxford University Press. p.311-328.