

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

TIZIANE FERNANDES MOLINA

ECOFISIOLOGIA EVOLUTIVA DE *Heliconius*: MORFOMETRIA DAS ASAS, METABOLISMO DO VOO, DO COMPORTAMENTO CANIBAL E ACLIMATAÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA
BIODIVERSIDADE

ECOFISIOLOGIA EVOLUTIVA DE *Heliconius*: MORFOMETRIA DAS ASAS,
METABOLISMO DO VOO, DO COMPORTAMENTO CANIBAL E
ACLIMATAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Tiziane Fernandes Molina

TESE DE DOUTORADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429

Fone: (051) 320-3500

CEP 90619-900 Porto Alegre - RS

Brasil

2019

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE CIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA
BIODIVERSIDADE

**ECOFISIOLOGIA EVOLUTIVA DE *Heliconius*: MORFOMETRIA DAS ASAS,
METABOLISMO DO VOO, DO COMPORTAMENTO CANIBAL E
ACLIMATAÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS**

Tiziane Fernandes Molina

Orientadora Dr^a. Guendalina Turcatto Oliveira

Coorientador Dr Aldo Mellender de Araújo

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE - RS - BRASIL

2019

Aos meus pais, Paulo e Eva, que nunca pouparam esforços e ao meu companheiro Gianfranco que possibilitou a caminhada nesses 4 anos.

Sempre parece impossível até que seja feito.

Mandela

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível devido a muitas pessoas (muitas mesmo) que estiveram comigo nesses quatro anos. Cada um com a sua responsabilidade e que talvez nem saibam o quanto me ajudaram.

As dificuldades foram muitas, assim como a de muitos outros colegas. A decisão de fazer o doutorado sem bolsa foi intempestiva e várias vezes o arrependimento batia devido às adversidades que surgiam, desde locomoção até alimentação. A falta das pessoas que amo próximas a mim nessa fase, e em meio a todas as atividades que tinha de fazer, fizeram mal a minha saúde. Pressões que me fizeram questionar se estava no lugar certo. Situações incontáveis que me faziam diariamente questionar o meu propósito e o meu sonho, mas com toda a certeza as pessoas que estão nesta seção tornaram de alguma forma o caminho mais ameno e possível.

A gentileza e a empatia pelo outro é capaz de transformar o momento de alguém. A força de vontade é de cada um e não cabe a ninguém julgar o quão forte ela é. Por isso os meus agradecimentos são aos que confiaram que eu seria capaz.

Aos meus pais, que em nenhum momento deixaram de perceber a importância do estudo e de me motivar a sempre seguir em frente, mesmo diante das dificuldades. A eles eu agradeço muito, por todo amor que sempre recebi e por eles eu busco e espero conseguir retribuir tudo o que sempre fizeram por mim.

Durantes esta etapa, sem dúvida nenhuma a família é uma das principais bases de apoio e eu tive a sorte de encontrar uma segunda família. A família do meu namorado que “me adotou”, me fez sentir parte deles e me acolheu. Sem essa ajuda com certeza eu não teria ficado nem o primeiro mês do doutorado em Porto Alegre. Um “muito obrigada” nunca será suficiente para expressar toda a minha gratidão a **Dona Ivone e ao Sr Jean**.

A parceria, o respeito e o carinho são os valores que fazem eu agradecer ao meu companheiro de vida nesta etapa, **Gianfranco**. Ainda não encontro palavras para expressar o quanto esse doutorado é dele também, o quanto foi importante a presença, muitas vezes não física, nesse caminho. Longas conversas no Skype, telefone, *whatsapp*, viagens, Alegrete, Criciúma, Chopinzinho, Porto Alegre, escutando minhas angústias, me encorajando, me aconselhando, lendo meus textos, me dando dicas,

montando imagens, fazendo coletas e sempre se preocupando comigo. Enfim, não poupando esforços para que eu concluísse essa etapa. A quem eu devo muito, a quem eu sempre vou agradecer, admirar e amar.

Desde as primeiras semanas da graduação eu sabia que queria seguir a carreira acadêmica e por sorte encontrei pessoas maravilhosas nesta minha caminhada. Profissionais aos quais devo o que eu sei hoje e o que eu serei amanhã. No mestrado tive um orientador incrível, **Rocco Di Mare**, uma pessoa ímpar, que era mais que um professor, era amigo e infelizmente nos deixou e não estará presente na minha defesa, mas tenho certeza que estaria muito feliz por ver a minha realização hoje e por saber que faz parte também de tudo isto. No doutorado não foi diferente, tive a sorte de encontrar e de ser acolhida pela professora **GUENDA** que confiou e apostou em mim. Essa confiança me motivou muito e o acolhimento que recebi dela no momento em que senti que minha força de vontade estava sendo questionada por outras pessoas, fizeram grande diferença. Essa confiança foi combustível para me mover. Aprendi muito com ela nos quatro anos, muito de Fisiologia, muito sobre estresse oxidativo, sobre vias metabólicas, mas principalmente aprendi a ser mais humana, a confiar nas pessoas e a ouvir. Este valioso ensinamento faz com que todos os outros tenham ainda mais valor. A minha orientadora, minha eterna gratidão. Não diferente meu coorientador Professor **ALDO**, é também a quem devo agradecer muito. Sempre li seus textos desde a graduação e ficava imaginando quão interessante poderia ser aprender com ele. Felizmente a parceria entre PUCRS e UFRGS se concretizou e a cada reunião eu sentia que aprendia algo novo. Suas palavras motivadoras, sua criticidade e disponibilidade foram muito importantes pra mim. Tenho muito orgulho dos meus orientadores e do quanto cresci com eles.

Agradeço também imensamente às amigadas que fiz durante esse tempo, aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia da Conservação (PUCRS), meu companheiro de “bancada” Artur que algumas vezes me acalmou enquanto eu inexperiente nas técnicas do laboratório, lá no começo, aprendia apreensiva e trêmula a pipetar e preparar os reagentes rrsrs. A Bruna e as proteínas carboniladas que tanto tomaram meu tempo de escrever, mas que me deram momentos valiosos de descontração. A Patrícia pelos longos e constantes desabafos, risos e por ser parceira em por em prática as ideias. A Técnica Gabriela sempre disposta nas preparações de tampões e organização de tudo,

sempre com bom humor. De modo geral, a todos os que ali estiveram nesses anos, Natália, Leici, Luiza, Jéssica, Diogo, Luiz e Robson.

As amigas do Laboratório de Genética Ecológica (UFRGS), pela parceria nas coletas, discussão de resultados, na criação das borboletas, incluindo sábados, domingos e feriados. Por mais cansativo que fosse e em algumas vezes preguiçoso de levantar de manhã, depois de estar lá, sempre me senti muito bem e feliz por estar fazendo o meu trabalho e também contribuindo para o trabalho das gurias, Etiele e Lica (Aline). A Janaína, minha inspiração, amiga e profissional que admiro imensamente e que cada vez que o Professor Aldo dizia que éramos parecidas em alguma coisa, me dava muito orgulho rrsrs.

Aos Professores componentes da minha banca de acompanhamento, Dra Mônica e Dr Jarbas que também compuseram minha banca de qualificação, juntamente com o Professor Dr Lucas Kaminsk (UFRGS), por todas as sugestões realizadas nesse período.

Aos coautores e colaboradores dos capítulos, Luiz Ernesto Costa-Schmidt, André Klein, Professor Léder Xavier, Professor Tiziano Dalla Rosa, que sempre dispostos e sábios auxiliaram, deram dicas e contribuíram muitíssimo para o trabalho aqui apresentado.

Aos Professores do Pós, em especial, o Professor Gervásio pelas ótimas aulas e discussões na disciplina de Entomologia.

Aos secretários, do PPGEEB (Pucrs) Patrícia, pela atenção, respeito e carinho com todos, e da mesma forma ao secretário Elmo do PPG Genética e Biologia Molecular da UFRGS que sempre disposto e simpático ajuda a todos.

Às técnicas Moema e Raquel, dos Laboratórios LABCEEM e Histologia por auxiliar na preparação e análises da microscopia eletrônica de transmissão.

As amigas de longa data que mesmo de longe apoiaram e torceram por essa realização, Thais, Jalusa, Liane, Lisie e Camila.

Aos demais amigos e familiares que apoiaram e contribuíram para a conclusão desta Tese.

À CAPES pela bolsa parcial de doutorado no PPG de Ecologia e Evolução da Biodiversidade - PUCRS

SUMÁRIO

ECOFISIOLOGIA EVOLUTIVA DE <i>Heliconius</i>: MORFOMETRIA DAS ASAS, METABOLISMO DO VOO, DO COMPORTAMENTO CANIBAL E ADAPTAÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS	2
AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMO	14
INTRODUÇÃO GERAL	177
Fisiologia Evolutiva.....	177
Mimetismo.....	177
Mimetismo Mülleriano	19
Borboletas <i>Heliconius</i>	20
Abordagens escolhidas para este estudo.....	22
Organismos de estudo.....	22
Balanço oxidativo: espécies reativas e sistema antioxidante.....	23
Metabolismo bioquímico.....	26
Voo	29
Canibalismo.....	32
Estresse ambiental: Temperatura.....	34
REFERÊNCIAS	36
OBJETIVO GERAL.....	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
COMENTÁRIO DA AUTORA	40
CAPÍTULO 1	41
RESUMO GRÁFICO	43
RESUMO	44
1.1 INTRODUÇÃO.....	45
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
1.2.1 Borboletas.....	47
1.2.2 Análise ultraestrutural dos músculos do voo por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	48
1.2.3 Densidade mitocondrial e de miofibrilas.....	48
1.2.4 Área mitocondrial	49
1.2.5 Análise da escala de cinza mitocondrial.....	49
1.2.6 Forma mitocondrial Z.....	50
1.2.7 Análises do balanço oxidativo.....	50

1.2.8 Análises do metabolismo energético	51
1.2.9 Análises estatísticas	53
1.3 RESULTADOS	54
1.3.1 Mitocôndrias e miofibrilas dos músculos do voo.....	54
1.3.2 Balanço oxidativo	57
1.3.3 Metabolismo intermediário.....	60
1.4 DISCUSSÃO	63
AGRADECIMENTOS	70
REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO 2	77
RESUMO	79
2.1 INTRODUÇÃO.....	80
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	81
2.2.1 Borboletas.....	81
2.2.2 Morfometria geométrica	82
2.2.3 Análises estatísticas	84
2.3 RESULTADOS	85
2.3.1 Variação no tamanho das asas	85
2.3.2 Variação na forma das asas	86
2.4 DISCUSSÃO	91
2.5 CONCLUSÃO.....	94
AGRADECIMENTOS	94
REFERÊNCIAS	95
CAPÍTULO 3	97
RESUMO	99
3.1 INTRODUÇÃO.....	100
3.2 METODOLOGIA.....	103
3.2.1 Borboletas.....	103
3.2.2 Testes de comportamento canibal	104
3.2.3 Lagartas	105
3.2.4 Análises do metabolismo energético	106
3.2.5 Análises do balanço oxidativo	106
3.2.6 Análises estatísticas	107
3.3 RESULTADOS	108
3.4 DISCUSSÃO	113
AGRADECIMENTOS	116
REFERÊNCIAS	116

CAPÍTULO 4	120
RESUMO GRÁFICO	122
RESUMO	123
4.1 INTRODUÇÃO.....	124
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	128
4.2.1 Testes de temperatura	129
4.2.2 Análises do metabolismo intermediário	130
4.2.3 Análises do balanço oxidativo	130
4.2.4 Análises estatísticas	131
4.3 RESULTADOS	132
4.3.1 Metabolismo intermediário.....	132
4.3.2 Enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica.....	133
4.4 DISCUSSÃO	134
AGRADECIMENTOS	143
REFERÊNCIAS	143
CONSIDERAÇÕES FINAIS	152

LISTA DE ABREVIATURAS

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

TBARS – ácido tiobarbitúrico

SOD – Superóxido dismutase

CAT – Catalase

GST – Glutathione S-Transferase

PCA – Análises de componentes principais

CVA – Análise de variáveis canônicas

C – Canibal

NC – Não canibal

L4C – Lagarta de 4^o *instar* (canibal - 1^o *instar*)

L4NC - Lagarta de 4^o *instar* (não canibal - 1^o *instar*)

PC – Pupa (canibal - 1^o *instar*)

PNC - Pupa (não canibal - 1^o *instar*)

RESUMO

O estudo sobre o mimetismo de *Heliconius* sempre recebeu muita atenção. Novas relações entre as espécies do gênero são descobertas em primorosos estudos. No entanto, quanto a Fisiologia do grupo existem poucas investigações. A relação estabelecida entre as espécies de *Heliconius* formando anéis miméticos ocorre tanto entre espécies pertencentes ao mesmo clado, como em espécies distantes filogeneticamente. Nesta Tese estudamos três espécies de *Heliconius* do sul do Brasil relacionando a Fisiologia e a morfologia com o mimetismo. Buscamos saber se o mimetismo existente entre o par mimético, *Heliconius besckei* (clado silvaniforme) e *Heliconius erato phyllis* (clado de acasalamento pupal) permanece em outras características além do padrão de coloração da asa. Além disso, investigamos se *H. besckei* diverge nestes mesmos parâmetros fisiológicos e morfológicos da espécie *H. ethilla narcaea*, que pertence também ao clado silvaniforme e assim como *H. e. phyllis* é simpátrica com *H. besckei* no sul do Brasil. Foram utilizadas metodologias de análise ultraestrutural da musculatura do tórax das borboletas, assim como também analisamos marcadores bioquímicos ligados ao balanço oxidativo e ao metabolismo intermediário. Para análise morfológica, utilizamos morfometria geométrica nas asas das três espécies para avaliar a forma e o tamanho. Nossos resultados mostraram que a espécie *H. besckei* convergiu com seu par mimético *H. erato phyllis*, para além do padrão de coloração, no tipo de voo, no tamanho e forma das asas anteriores, na massa corporal (tórax e abdômen), além de alguns marcadores do balanço oxidativo (TBARS, SOD e GST) e do metabolismo intermediário (conteúdo de proteínas totais, lipídios totais, triglicerídeos, colesterol e glicogênio). No entanto, devido às restrições à ambientes de altitudes maiores que 700m, as exigências fisiológicas de *H. besckei* para viver em simpatria com a espécie mimética parecem dispendiosas. Dessa forma, alguns parâmetros como a área mitocondrial, a atividade da catalase e os níveis de ácido úrico e lactato foram divergentes. Além disso, investigamos também os marcadores bioquímicos de lagartas e pupas de *H. e. phyllis* em relação ao comportamento canibal que apresentam enquanto larvas de 1° instar. Nossos resultados não mostraram diferenças significativas entre animais que apresentaram comportamento canibal e não canibal sobre os marcadores de estresse oxidativo e metabolismo. Contudo, os níveis de colesterol são mais baixos e de GST mais altos em lagartas de 4° instar que não apresentaram o comportamento canibal. Estes resultados são interessantes quando analisamos o tempo de desenvolvimento por instar, onde os indivíduos que apresentam comportamento canibal sofrem ecdise mais rapidamente do 1° para o 2° instar. Analisamos também a resposta de lagartas de *H. ethilla narcaea* frente a duas temperaturas (19° e 24°C) de ambientes em que normalmente são encontradas. Registramos que lagartas de 5° instar mantidas a 24°C apresentam menor massa corporal e menores níveis de lactato quando comparadas com as lagartas mantidas em 19°C. Não obtivemos diferenças em relação aos marcadores de balanço oxidativo, o que juntamente com os outros resultados pode indicar que as lagartas mantidas em temperaturas mais quentes ajustem possivelmente, seu comportamento, sua atividade metabólica, priorizando através da ingesta o acúmulo de moléculas antioxidantes oriundas do alimento ofertado (*Passiflora edulis*), dessa forma conseguem frear o aumento de ERO. Nossos resultados são novos, importantes e

originais fontes de informação sobre as espécies de *Heliconius* e principalmente sobre as espécies ocorrentes no sul do Brasil.

Palavras-chave: mimetismo; fisiologia, evolução, Lepidoptera

ABSTRACT

The study of *Heliconius* mimicry has always received much attention. New relationships among species of the genus are discovered in exquisite studies. However, there are few investigations regarding the group's Physiology. The relationship established between *Heliconius* species, forming mimetic rings, occurs both between species belonging to the same clade, as in phylogenetically distant species. In this thesis we studied three species of *Heliconius* from southern Brazil relating Physiology and morphology with mimicry. We sought to know whether the existing mimicry between the mimetic pair *Heliconius besckei* (silvaniform clade) and *Heliconius erato phyllis* (pupal mating clade) remains in other characteristics beyond the wing coloration pattern. In addition, we investigated whether *H. besckei* diverges in these same physiological and morphological parameters of the species *H. ethilla narcaea*, which also belongs to the silvaniform clade and as well as *H. e. phyllis* is sympatric with *H. besckei* in southern Brazil. Ultrastructural analysis methods were used to investigate the butterflies' musculature of the thorax, as well as the study of biochemical markers linked to the oxidative balance and to the intermediate metabolism. For morphological analysis, we used geometric morphometry on the wings of the three species to evaluate shape and size. Our results showed that the species *H. besckei* converged with its mimetic pair *H. erato phyllis*, beyond the coloration pattern, in flight type, size and shape of anterior wings, body mass (thorax and abdomen), besides some markers of oxidative balance (TBARS, SOD and GST) and intermediate metabolism (total protein content, total lipids, triglycerides, cholesterol and glycogen). However, due to constraints to environments with altitudes higher than 700m, the physiological requirements of *H. besckei* to live in sympathy with the mimetic species seem costly. Thus, some parameters such as mitochondrial area, catalase activity and uric acid and lactate levels were divergent. In addition, we also investigated the biochemical markers of caterpillars and pupae of *H. e. Phyllis* in relation to the cannibal behavior that they present as 1st instar larvae. Our results did not show significant differences between animals that presented cannibal and not cannibal behavior on the markers of oxidative stress and metabolism. However, cholesterol levels are lower and GST is higher in 4th instar caterpillars that did not show cannibal behavior. These results are interesting when we analyze the development time per instar, where individuals with cannibal behavior undergo *ecdysis* more quickly from 1st to 2nd instar. We also analyzed the response of *H. ethilla narcaea* caterpillars to two temperatures (19° and 20 °C) of environments in which they are normally found. We recorded that 5^o instar caterpillars maintained at 24°C presented reduced body mass and reduced levels of lactate when compared to caterpillars maintained at 19°C. We did not obtain differences in relation to oxidative balance markers, which together with the other results may indicate that caterpillars maintained at warmer temperatures possibly adjust their behavior, their metabolic activity, prioritizing through ingestion the accumulation of antioxidant

molecules from food (*Passiflora edulis*), in this way they can stop the increase of ERO. Our results are new, important and original sources of information on the species of *Heliconius* and specially on the species occurring in southern Brazil.

Key-words: mimmetism, physiology, evolution, Lepidoptera

INTRODUÇÃO GERAL

Fisiologia Evolutiva

Os estudos sobre Fisiologia comparada e ontogenética surgiram no século XIX e no início do século XX e a partir disso, a visão sobre a importância destes dois métodos para as bases da evolução se modificou.

A Fisiologia evolutiva aborda questões relacionadas à evolução funcional e recruta métodos de áreas científicas aliadas, como Bioquímica, Morfologia e Biologia Molecular. Além disso, esta é uma área em ativa progressão e hoje considera uma variedade de temas a serem abordados. Algumas destas questões são amplas, como o estudo de padrões ecológicos e filogenéticos relacionados à Fisiologia, bem como o estudo do genótipo, fenótipo, desempenho fisiológico e *fitness*.

Diante de questões tão complexas como estas e de outras tantas que poderiam ser aqui descritas, a Fisiologia Evolutiva utiliza técnicas e abordagens da Biologia evolutiva, genética e sistemática.

A presente Tese aborda a Ecofisiologia Evolutiva de características das borboletas do gênero *Heliconius* no sul Brasil. Nesse trabalho utilizamos abordagens fisiológicas, evolutivas e ecológicas, combinadas de forma a tentar responder questões ainda não investigadas a cerca do grupo. Além disso, utilizando técnicas e metodologias originais para agregar conhecimento ao grupo de borboletas amplamente estudadas.

Mimetismo

A seleção natural atua sobre características que melhoram a sobrevivência e a reprodução de indivíduos. Para muitos organismos, sobreviver significa evitar ao máximo ser predado. Muitas espécies desenvolveram estratégias que lhes permitem evitar ataques (Ruxton, Sherratt & Speed, 2004), sendo estas, muito diversas. Algumas

destas estratégias são ditas enganosas, tais como camuflagem, para dificultar a visualização de predadores ou para desviá-los do seu alvo. A estratégia do aposematismo, por exemplo, anuncia as defesas estruturais ou químicas ou outras formas de não ser rentável ao predador por meio de sinais de alerta.

Em contraste com as estratégias enganosas (camuflagem, manchas ocelares, etc.), muitas presas adquirem ou sintetizam compostos químicos e anunciam essas defesas aos predadores em potencial na forma de cores vivas. Esta estratégia é chamada de aposematismo. Nesses casos, os organismos assumem frequentemente a forma de sinais de alerta que são aprendidos, reconhecidos e conseqüentemente evitados pelos predadores. Por exemplo, as borboletas impalatáveis, tais como as *Heliconius* que mostram cores vívidas e contrastadas. Tais sinais são evitados pela maioria dos predadores, uma vez que eles experimentaram suas toxinas. Nesses casos predadores ingênuos, inexperientes, têm que atacar e muitas vezes provar a presa para perceber que é tóxica ou venenosa.

Os benefícios para a presa residem na probabilidade de um determinado predador já ter experimentado este padrão de presa e abster-se de atacá-lo. Portanto, os benefícios de sobrevivência dependem da frequência/densidade da presa no ambiente. Esta é uma forma de dependência de frequência/densidade que favorece as formas mais comuns.

Naturalmente, o benefício de adotar uma cor de advertência também se aplica além das fronteiras das espécies. Quando indivíduos de duas espécies com padrões de alerta são expostos ao mesmo conjunto de predadores eles se beneficiam de compartilhar o mesmo sinal porque ambas as espécies se beneficiam da aprendizagem dos predadores. As espécies aposemáticas relacionadas evoluíram sinais de alerta convergentes, um fenômeno chamado mimetismo Mülleriano, após o alemão Fritz Müller o formalizar pela primeira vez (Stuckert, Venegas & Summers, 2014). Por exemplo, algumas borboletas aposemáticas neotropicais e as mariposas compartilham padrões de cor de asa conspícuos. Espécies que compartilham sinais de aviso são chamadas comímicas e formam "anéis" miméticos que podem compreender mais de 15 espécies localmente (Elias *et al.*, 2008). As presas comestíveis também podem se beneficiar da exibição dos mesmos sinais de defesa das presas. Essa forma enganosa de mimetismo é chamada mimetismo Batesiano, assim denominada depois que o naturalista britânico Henry Bates relatou semelhança impressionante entre espécies de

borboletas amazônicas inofensivas e tóxicas (Bates, 1862). O mimetismo Batesiano e o Mülleriano receberam de Vane-Wright (1976), os nomes mais genéricos de “mimetismo antérgico defensivo” (ou “antérgico tipo VI”) e “mimetismo sinérgico de advertência” (ou “sinérgico tipo IA”), respectivamente. Estes nomes seguem uma classificação de 48 tipos possíveis de mimetismo com base em um sistema tripartido (modelo-mímico-operador), originalmente proposto por Wolfgang Wickler em seu livro *Mimicry in Plants and Animals* (1968). Um dos objetivos da proposta de Vane-Wright foi o de evitar nomes de tipos miméticos, como por exemplo, mimetismo Peckhamiano, Wasmanniano, os quais não discriminam o que de fato acontece nos diferentes casos de mimetismo. Todavia, os dois casos clássicos, mimetismo Batesiano e Mülleriano, já adquiriram história e assim, permanecem na literatura.

Mimetismo Mülleriano

Em 1862, Bates abordou as semelhanças exibidas por muitas espécies de borboletas neotropicais e propôs que em alguns casos isso poderia ser explicado pela seleção natural de espécies semelhantes a espécies desagradáveis e assim passariam a ter proteção contra a predação, o que se conhece hoje como mimetismo Batesiano. No entanto, ele também observou que algumas espécies de borboletas aparentemente desagradáveis pareciam umas às outras e propôs que isso ocorria devido à presença de condições ambientais comuns.

O naturalista Johannes Friedrich ('Fritz') Müller, fez considerações a respeito desse mesmo fenômeno e propôs soluções diferentes. Dezesesseis anos após a publicação do trabalho de Bates, Müller (1878) publicou uma explicação para a semelhança entre espécies ditas desagradáveis que até agora é amplamente aceita. A explicação de Müller (1878) foi a de que espécies que apresentam defesas extremamente simples podem evoluir e compartilhar os custos da aprendizagem dos predadores. Dentro deste mesmo documento, Müller apoiou os seus argumentos com um exemplo quantitativo específico. O documento mais conhecido de Müller foi publicado na revista 'Kosmos' em 1879, nele sua hipótese, mais tarde chamada de mimetismo Mülleriano, foi amplamente aceita (Mallet, 1999).

Bates nunca foi convencido pela teoria, embora tenha usado alguns argumentos para explicar o mimetismo em heliconíneos (Mallet, 1999) revelando que tinha uma

compreensão precoce sobre a dependência da frequência numérica no mimetismo. O primeiro trabalho de Fritz Müller (1879) apresenta não só o primeiro modelo de mimetismo, como também uma das primeiras derivações das consequências da adoção dos traços específicos por cada espécie. O modelo continua a ser o mais aceito para articular sua teoria, mesmo Blakiston e Alexander (1884) tendo proposto um refinamento para este modelo, ele continua exatamente igual. Müller assumiu que as presas individuais representam uma dose de toxinas e que a população de predadores aprende a evitar a presa. Assim, menos espécies altamente tóxicas tendem a ser consumidas. O modelo foi revisto por Mallet e prevê que nos casos em que ambas as espécies apresentam gosto ruim, simultaneamente as espécies que apresentam menor dose de toxicidade e menor abundância evoluirão para uma aparência mais parecida com a espécie com maior produto de dose e abundância (Mallet, 1999).

O exemplo mais célebre do mimetismo Mülleriano é o da similaridade entre as borboletas do gênero *Heliconius* impalatáveis a aves insetívoras. O gênero reúne conjuntos de borboletas cujos membros se assemelham uns aos outros de alguma forma, os anéis miméticos mullerianos. Estes anéis miméticos são tipicamente reconhecidos pela semelhança da coloração: tigre, vermelho, azul e laranja (Mallet & Gilbert, 1995). Alguns anéis miméticos contém até 12 espécies de *Heliconius*, bem como imitadores de outros grupos de lepidópteros (Brower, 1997). Os membros de cada anel tendem a dormir à noite em ambientes similares (Mallet & Gilbert, 1995) e também tendem a voar em ambientes similares e ao mesmo tempo do ano.

Borboletas *Heliconius*

As borboletas *Heliconius* são um exemplo de grupo taxonômico amplamente estudado e que tem contribuído para a compreensão de muitas questões evolutivas (Merrill *et al.*, 2015).

Os evolucionistas foram atraídos pelo padrão marcante da asa que reflete o mimetismo. Linhagens convergiram repetidamente para os mesmos padrões de cores de advertência. As borboletas do gênero *Heliconius* são modelos para estudos genômicos, estudos de ecologia, de seleção natural, e de especiação (Brown, 1981), dentre outros. A forte seleção do padrão de coloração de asa para confundir os predadores, fazendo com que estes aprendam a evitar os padrões de cores destes insetos impalatáveis explica

o mimetismo (Benson, 1972; Kapan, 2001). Existe uma convergência impressionante do padrão entre as espécies distantemente relacionadas que se beneficiam de um sinal compartilhado para confundir os predadores.

As interações antagônicas entre predadores e presas muitas vezes levam a coevolução. No caso das espécies de *Heliconius*, as cores aposemáticas agem como sinais de alerta para os predadores e desempenham um papel protetor. Os glicosídeos cianogênicos que são sintetizados pelos organismos ou sequestrados da planta hospedeira pelas larvas, conferem a *Heliconius* um sabor desagradável a seus predadores vertebrados (Engler, Spencer & Gilbert, 2000; Cardoso & Gilbert, 2007; Engler-Chaouat & Gilbert, 2007; Chauhan *et al.*, 2013). Os predadores são aves insetívoras que aprenderam a associar o padrão de cores das asas das borboletas com o mau gosto que proporcionam, dessa forma tendem a evitá-las (Langham, 2004).

A convergência evolutiva dos padrões de cores entre presa tóxica e o predador evoluiu devido à seleção positiva dependente de frequência/densidade e dos benefícios da semelhança mútua. Espécies comiméticas evoluem com padrões de cores muito semelhantes; no entanto esse processo pode interferir na sinalização intraespecífica (Llaurens, Joron & Théry, 2014).

Os padrões de asa de *Heliconius* além de repelir predadores, pois possibilitam o reconhecimento intra-específico, a seleção sexual e também a regulação térmica. O fato é que estes padrões de cor significam funcionalmente uma ligação entre a diversidade de desenvolvimento, adaptação e macroevolução (Joron *et al.*, 2006). As *Heliconius* apresentam a alimentação por pólen como uma característica que facilita à rápida radiação adaptativa (Gilbert, 1972).

Análises morfológicas e moleculares possibilitaram a resolução da filogenia completa da tribo Heliconiini (Brown, 1981; Lee *et al.*, 1992; Brower, 1997; Penz, 1999; Mallet *et al.*, 2007; Kozak *et al.*, 2015; Merrill *et al.*, 2015). Com a aplicação de relógios moleculares estima-se que a tribo apareceu pela primeira vez entre 24 e 29 milhões de anos atrás e o gênero *Heliconius* entre 10,5 e 13,4 milhões de anos (Kozak *et al.*, 2015). A biogeografia de *Heliconius* no passado era discutida com referência na teoria do refúgio do Pleistoceno que propõe que altas taxas de especiação alopátrica são resultantes da fragmentação das florestas tropicais. No entanto, esta teoria vem sendo muito criticada (Merrill *et al.*, 2015) e o tempo de que se tem conhecimento sobre a

filogenia indica que a maior parte das espécies de Heliconiini antecede significativamente o Pleistoceno (Kozak *et al.*, 2015).

O modelo de diversificação por alopatria parece insuficiente para explicar a radiação de *Heliconius*, especialmente considerando que as comunidades mais ricas em espécies estão dentro das florestas contíguas da Amazônia. Uma alternativa a teoria do refúgio é a especiação impulsionada por condições de adaptação às condições locais. As taxas de diversificação em *Heliconius* tem aumentado desde o surgimento do gênero em meados do Mioceno (Kozak *et al.*, 2015). Se a especiação sempre ocorre em simpatria ainda não é completamente compreendido, apesar de em *Heliconius* existir polimorfismos estáveis acoplados com arquiteturas genéticas específicas, o que tornaria mais plausível essa explicação. O cenário mais provável é que a especiação é iniciada em parapatia, e uma vez que as populações divergiram suficientemente para a convivência, o processo é concluído em simpatria (Mallet, Jiggins & McMillan, 1998).

Abordagens escolhidas para este estudo

De forma a responder questões sobre a evolução do mimetismo em espécies de *Heliconius* do sul do Brasil, utilizamos neste estudo abordagens do campo da Fisiologia Evolutiva. As metodologias aplicadas para testar as hipóteses se deram através de análises do balanço oxidativo e do balanço bioquímico, técnicas de análises ultraestrutural do organismo, morfometria geométrica, testes de comportamento e resposta a temperatura.

Organismos de estudo

Heliconius besckei Ménétriés 1857 tem distribuição mais restrita em relação a outras espécies do mesmo gênero que ocorrem no sul do Brasil. Esta espécie ocorre em localidades com altitude maiores que 700 metros, no Sul e Sudeste, com apenas um registro para o Nordeste do Brasil (Cardoso, 2005). A espécie pertence ao clado silvaniforme, o mesmo de *Heliconius ethilla* Godart 1819, que ocorre no Sul, sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil. A espécie *Heliconius erato* pode ser encontrada desde o Sul até o Nordeste e do Centro-Oeste até a costa litorânea. Apesar de pertencer ao clado das espécies que apresentam “cruzamento pupal”, *H. erato phyllis* (subespécie) é

indistinguível, em vôo, de *H. besckei*. No entanto, devido à limitação de ocorrência de *H. besckei*, o par mimético é restrito às áreas de simpatria (Figura 1).

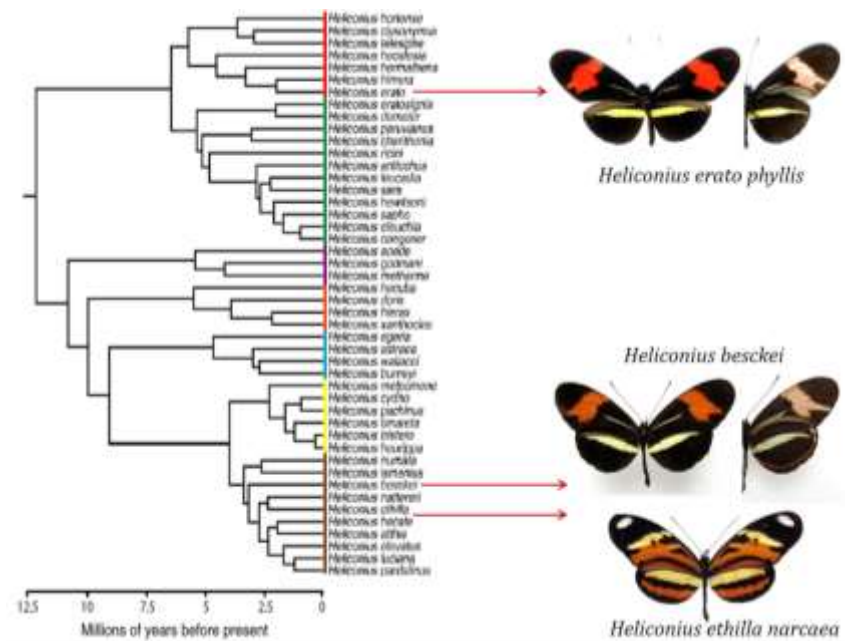


Figura 1. Filogenia de *Heliconius* adaptada de Merrill *et al* (2015) mostrando em destaque as três espécies utilizadas neste estudo.

Balanco oxidativo: espécies reativas e sistema antioxidante

O estresse oxidativo faz parte das alterações fisiológicas em resposta ao estresse ambiental causado por diferentes fatores, temperatura, competição, predação, reprodução, entre outros. Em organismos aeróbios cerca de 90% do oxigênio celular é consumido pelas mitocôndrias para produzir energia como molécula de ATP. O principal efeito colateral da produção de ATP é a formação de espécies reativas. Espécies reativas incluem uma variedade de moléculas, geradas a partir da atividade metabólica (Mayntz & Toft, 2006; Barja, 2007). Estas espécies reativas podem induzir modificações químicas em outras moléculas como a geração de danos oxidativos, mas também atuam como mensageiros em redes de transdução de sinal. Constituem-se principalmente de “espécies reativas de oxigênio” (ERO) e “espécies reativas de carbonila” (ERC) (Pamplona & Costantini, 2011). Em sistemas biológicos, sabe-se que a membrana celular constitui um dos focos de atuação de ERO, “espécies reativas de nitrogênio” (ERN) e de outras espécies reativas. As ERO e as ERN desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sanguínea, a sinalização

celular, a apoptose e a fagocitose de agentes patogênicos, entre outros. Contudo, os danos celulares resultam basicamente de ataques de ERO e ERN sobre as macromoléculas, como os açúcares, DNA, proteínas e lipídios (Gille & Sigler, 1995; Hogg & Kalyanaraman, 1999).

As ERO incluem todos os radicais do oxigênio, como o ânion radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (HO^\bullet), radical alquila (L^\bullet), alcóxila (LO^\bullet) e peróxila (LOO^\bullet). Nas ERN estão incluídos além do peroxinitrito ($ONOO^-$), o óxido nítrico (NO^\bullet) e o radical dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) (Hogg & Kalyanaraman, 1999). O ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o ácido hipocloroso ($HOCl$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o ozônio (O_3) não são radicais livres; contudo, também podem induzir reações de radicais no organismo, sendo dessa forma também considerados como espécies reativas (Benzie, 1996).

As ERO estão naturalmente e constantemente sendo produzidas durante a respiração mitocondrial em células aeróbicas. Grande parte do oxigênio é utilizada comoceptor final de elétrons na respiração mitocondrial, o que resulta na formação de água, entretanto, estima-se que 0,1-2,0% do oxigênio é convertido no radical superóxido. O ânion superóxido é assim o produto de uma redução de um elétron de oxigênio e o precursor das demais ERO. A dismutação do ânion superóxido, seja ela espontânea ou por meio de reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez, pode ser completamente reduzido à água, ou na presença de íons de cobre ou de ferro pode ser reduzido à forma altamente reativa de radicais hidroxila (HO^\bullet).

Além da produção endógena, as ERO podem ser produzidas por fontes exógenas. No caso de insetos herbívoros, a alimentação é uma importante fonte exógena geradora de ERO (Korayem, Khodairy & El-sonbaty, 2012). Os processos nos quais as ERO participam envolvem reações de redução-oxidação (ou redox), isto é, envolvem a transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio de um reagente a outro.

Os diferentes componentes antioxidantes surgiram para lidar com o alto potencial reativo das ERO. Esse sistema juntamente com estas moléculas altamente reativas exercem importantes papéis em vias de sinalização celular e estão envolvidas em um amplo campo de processos fisiológicos (Dickinson & Chang, 2011). A função do sistema antioxidante é manter os níveis basais e regular a localização de ERO nas

células. Entretanto, quando a produção de ERO supera a capacidade de controle do sistema antioxidante a sinalização é perturbada e ocorre o estresse oxidativo (Jones, 2006; Sies, 2018) ocorrendo danos oxidativos a biomoléculas, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Pamplona & Costantini, 2011).

Sendo assim, os mecanismos antioxidantes são quaisquer mecanismos, estruturas e/ou substâncias que impedem, atrasam, removem ou protegem contra danos a uma molécula alvo. A proteção contra dano oxidativo é crucial para a funcionalidade do organismo. Uma das principais consequências do dano oxidativo é a perda da função e integridade estrutural de biomoléculas modificadas. Este processo tem amplas consequências funcionais, como a indução de disfunções celulares e danos em tecidos (Pamplona & Costantini, 2011).

Em organismos aeróbicos, o sistema antioxidante é constituído por uma rede de componentes, enzimático e não-enzimático (Hermes-Lima, 2004). Os insetos possuem um conjunto de enzimas antioxidantes e de moléculas não enzimáticas antioxidantes que podem formar uma resposta concatenada para um ataque produzido endogenamente por oxidantes. As enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-transferase (GST) e glutathione reductase (GSR) têm sido bem caracterizadas em insetos. Antioxidantes solúveis em água e solúveis em lipídios, tais como ascorbato, glutathione, tocoferol, e os carotenóides, em contrapartida, não recebem a mesma atenção, enquanto também desempenham importantes papéis antioxidantes (Felton & Summers, 1995).

As superóxido dismutases catalisam a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$. Em eucariontes, as superóxido dismutases de cobre e zinco (CuZnSODs) são encontradas no citosol, lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembrana mitocondrial, enquanto a superóxido dismutase de manganês (MnSOD) também denominada de SOD₂, encontra-se no interior da mitocôndria (Hermes-Lima, 2004).

A enzima superóxido dismutase desempenha um papel importante na conversão $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , peróxido de hidrogênio. A atividade da SOD intracelular é concentrada na mitocôndria como MnSOD e no compartimento citosólico como Cu/ZnSOD. A atividade da enzima SOD é regulada através de biossíntese e estimulada pelo aumento da tensão de oxigênio ou compostos químicos (Yu 1994 *apud* Korsloot *et al*, 2004). Geralmente, o H_2O_2 não é suficientemente reativo para oxidar muitas moléculas

orgânicas em um ambiente aquoso. No entanto, é um oxidante biologicamente importante devido à sua capacidade para gerar o radical muito reativo, hidroxila (OH·). A importância biológica de H₂O₂ também resulta da sua capacidade de se difundir através de membranas hidrofóbicas com relativa facilidade. O peróxido de hidrogênio é normalmente decomposto para H₂O através de dois sistemas de enzimas: catalase (CAT) e da glutatona peroxidase (GSH-Px).

As catalases promovem a decomposição direta do peróxido de hidrogênio e oxigênio e as peroxidases removem o peróxido de hidrogênio enquanto oxidam outro substrato. Tanto na reação das catalases quanto das peroxidases ocorre a formação de água. A catalase é uma enzima importante na defesa antioxidante, predominantemente presente nos peroxissomos da célula, e que contém ferro ativo (Korsloot *et al.*, 2004).

A glutatona é um tripeptídeo, γ -L-Glutamil-L-cisteinilglicina e suas funções incluem ação direta sobre ERO, ação de substrato de enzimas do sistema antioxidante e age também como tampão redox (Lushchak & Lushchak, 2012). A glutatona é encontrada nas formas: reduzida (GSH), dissulfeto (GSSG) e dissulfeto misto ligado a outros tióis celulares (GS-SR). As glutatonas transferases (GST) formam um grupo de enzimas que é responsável pela biotransformação de xenobióticos e de produtos da peroxidação lipídica, pois consegue conjugar estes com moléculas de glutatona facilitando sua excreção (Mannervik *et al.*, 2005). As GST tem função também de resistência a choques térmicos e a ligação e transporte de biomoléculas (Listowsky *et al.*, 1988).

Metabolismo bioquímico

Os insetos gastam energia constantemente, e se não estão se alimentando devem ter reservas acumuladas em períodos de abundância de alimento. O glicogênio e os triglicerídeos são reservas de energia em células animais. O glicogênio pode ser facilmente degradado sob demanda para ser usado como um combustível glicolítico (Arrese & Soulages, 2010). Já os ácidos graxos armazenados como triglicerídios podem ser utilizados para a produção de energia através da β -oxidação (Athenstaedt & Daum, 2006).

As reservas de gordura são as reservas mais importantes utilizadas pelos insetos para a demanda da diapausa (Hahn & Denlinger, 2007), para fornecer energia para o

embrião em desenvolvimento (Ziegler & Van Antwerpen, 2006), e como combustível para períodos prolongados de voo (Beenackers, 1984 *apud* Soulages, 2010). O armazenamento de ácidos graxos e glicose também é essencial em insetos para outras funções. Os ácidos graxos servem como precursores de eicosanóides e feromônios e são necessários em quantidades substanciais para a síntese de fosfolipídios e ceras (Lockey, 1988).

Da mesma forma, a glicose é utilizada para a síntese de quitina, que é o componente principal da cutícula (Lockey, 1988) e para a síntese de álcoois de açúcar, que são necessários para a adaptação ao frio (Storey, 1997) ou à seca (Watanabe *et al.*, 2002). O glicogênio pode ser quase esgotado após a metamorfose, e o novo adulto recupera as reservas de glicogênio quando a alimentação recomeça (Ziegler, 1991; Lorenz & Anand, 2004). A quantidade de glicogênio é significativamente menor do que a de gordura e oscila consideravelmente com base na atividade motora e de curta duração ou em condições ambientais adversas (Timmermann & Briegel, 1999; Anand & Lorenz, 2008).

Como as reservas de lipídios permanecem estáveis durante o descanso da vida larval, elas são utilizadas em pupas e adultos (Soulages, 2010). Os ácidos graxos armazenados nas gotículas lipídicas do corpo gorduroso são mobilizados incluindo o fornecimento de energia aos músculos de voo, sob a forma de diglicerídios, trealose ou prolina. Os lipídios também são mobilizados para a hemolinfa em resposta a desafios. Um estudo das interações mosquito-parasita (*Plasmodium falciparum* e *Anopheles gambiae*) confirmaram que os mosquitos infectados apresentam transcrição de proteínas lipofórmicas (Mendes *et al.*, 2008). A natureza dos sinais que mobilizam os lipídios durante as infecções e o destino dos lipídios mobilizados ainda não são totalmente conhecidos (Soulages, 2010).

Os aminoácidos, constituintes das proteínas, derivados da dieta dos insetos tem funções importantes que incluem a síntese de proteínas estruturais do tegumento, síntese de hormônios e enzimas que participam de reações metabólicas, sendo que alguns aminoácidos também participam da síntese de ácidos nucleicos. Os mesmos 20 aminoácidos estão envolvidos em construir as proteínas de todos os seres vivos, das bactérias aos vertebrados. Os insetos empregam esses 20 aminoácidos na síntese de proteínas, destes, nove não podem ser sintetizados pela intervenção de outros

aminoácidos, são os essenciais que devem ser ingeridos como componentes da dieta. Os outros 11 aminoácidos, são os não essenciais e podem ser derivados por conversões bioquímicas. O conceito de essencial e não essencial não está inteiramente claro. Em geral, insetos e vertebrados compartilham os mesmos nove aminoácidos essenciais (Klowden, 2013).

Os aminoácidos que estão presentes na hemolinfa tem grande contribuição osmótica, representando por vezes mais de 30% da sua atividade osmótica total. Alguns grupos de insetos utilizam o aminoácido prolina como substrato metabólico para a energia de voo, além de usar também gorduras e carboidratos. A tirosina, por exemplo, é necessária para a esclerização cuticular, e o glutamato está envolvido no processo de neurotransmissão. Nos insetos, algumas das proteínas mais importantes são as proteínas que são depositadas na nova cutícula formada e que participam da esclerização cuticular, estas proteínas são amplamente utilizadas por células epidérmicas (Klowden, 2013). As vitelogeninas, também são proteínas muito importantes, pois consistem em fornecer requisitos para o ovo. Em contraste com os lipídios e carboidratos que podem ser facilmente armazenados, os aminoácidos que são ingeridos em excesso não são utilizados para as necessidades imediatas tornam-se geralmente combustível metabólico ou são excretados. Contudo, em muitos insetos holometábolos existe uma necessidade de armazenamento de proteínas. A proteína que é adquirida durante a fase de larva ou lagarta é transportada para os estádios pupal e adulto, que requerem muita proteína e custam a adquiri-la. Essa proteína é essencial para a metamorfose, reprodução e manutenção geral corporal.

Embora relatado em poucos insetos, em alguns casos o lactato é o principal produto final do glicogênio. O lactato, por exemplo, acumula-se no músculo da tíbia extensora de gafanhotos durante o salto (Harrison, 2015). O lactato também já foi relatado como produto final primário anaeróbio dos Collembola durante evento de afogamento (Zinkler; Russbeck, 1986 *apud* Harrison, 2015). Os músculos segmentais intersegmentais de muitas larvas de coleópteros e lepidópteros apresentam lactato desidrogenase, sugerindo que esses insetos podem utilizar a produção de lactato anaeróbio para a geração de ATP durante a atividade de ecdise.

O ácido úrico está presente nas excretas dos insetos, o que gera interesse pelo entendimento do mecanismo pelo qual o metabólito nitrogenado encontra seu caminho

no intestino. Acredita-se que os túbulos de Malpighi descarregam ácido úrico na parte posterior do canal do sistema, mas são conhecidos alguns casos em que o ácido úrico não foi demonstrado nos túbulos, embora tenha sido registrado na excreta e no corpo de gordura. O estudo de Srivastava; Gupta (1961) corroborou as informações anteriores de que em baratas *Periplaneta americana*, ocorre a ausência de ácido úrico nos túbulos de Malpighi e presença de grandes quantidades no corpo de gordura. Wigglesworth (1932) *apud* Srivastava; Gupta, (1961) relatou a ausência de ácido úrico nos túbulos de Malpighi de *Lepisma saccharina* (Ordem: Thysanura), *Forficula auricularia* (Dermaptera) e *Chrysopa perla* (Neuroptera).

Segundo o autor, os túbulos de malpighi destes insetos contem apenas matéria fluida, e a maioria do ácido úrico permanece armazenado nas células de urato do corpo de gordura. Nas excretas de baratas é foi evidenciado a presença de ácido úrico. Existem poucos registros tentando explicar como o ácido úrico é encontrado nas excretas e não está nos túbulos de malpighi. A possibilidade que se aceita é a de que o ácido úrico ou outros conjugados entrem diretamente através de alguma porção de alimento. Algumas evidências estão disponíveis na literatura de que o intestino médio pode ajudar na eliminação do ácido úrico (Srivastava & Gupta, 1961). Presume-se que uma pequena quantidade de ácido úrico, presentes no intestino médio de larvas de *Bombyx mori* (Lepidoptera) não são recolhidas a partir do fluido corporal e sim produzidas localmente como metabolismo tecidual (Srivastava & Gupta, 1961). Várias referências mais atuais reforçam a ideia de que o ácido úrico é sintetizado principalmente no corpo de gordura. Durante o crescimento larval, o ácido úrico é liberado para a hemolinfa logo após a síntese e é subsequentemente excretado pelos túbulos de malpighi. O ácido úrico constitui também um importante fluido antioxidante. Um estudo em indivíduos de *Drosophila melanogaster* impossibilitadas de sintetizar ácido úrico teve susceptibilidade aumentada frente ao estresse oxidativo, diferente dos organismos que sintetizaram o composto (Souza *et al.*, 1996).

Voo

Os insetos foram os primeiros animais no planeta a voar. As modificações que levaram os insetos ao voo provavelmente ocorreram há 350 milhões de anos e acredita-se ter acontecido apenas uma vez durante o curso da evolução dos insetos, já que todos

os insetos pterigotos parecem descender de um ancestral comum. Esta adaptação foi tão bem sucedida que cerca de 98% das espécies de insetos atuais são, ou já foram, capazes de voar. Conseguir estabelecer o voo foi provavelmente a etapa evolutiva mais importante em toda a história dos insetos, adquirindo vantagens significativas em encontrar alimento, localizar companheiros, colonizar novos habitats e escapar da predação (Klowden, 2013).

O desenvolvimento de voo foi acompanhado de uma maior capacidade de processamento de informações através do sistema nervoso central de insetos. As asas completamente funcionais são encontradas apenas em insetos adultos. As asas membranosas são reforçadas com veias transversais longitudinais rígidas e que podem conter nervuras, alimentadas pela hemolinfa que flui através delas. O padrão de veias presentes em um determinado inseto reflete a sua ascendência evolutiva, as relações entre os outros grupos de insetos, e pode ser usado para classificá-los (Klowden, 2013).

Os músculos de voo são geralmente os mais desenvolvidos músculos do corpo de um inseto e ocupam a maior parte do espaço no tórax. A massa total do músculo do voo deve ser maior que 12% da massa corporal, a fim de suportar o peso do inseto durante o voo. Os músculos de voo de muitos insetos sofrem uma maturação durante o estágio adulto. Existem três categorias gerais de músculos que permitem os insetos voarem: direto, indireto e acessórios (Klowden, 2013).

A condição primitiva é ter dois pares de asas que são minimamente coordenados e bater de forma independente, apesar de sua estreita associação em segmentos torácicos próximos certamente influenciar os seus movimentos. Em Lepidoptera, as duas asas são mecanicamente acopladas por lóbulos ou espinhos na base da asa. Em alguns lepidópteros, um lóbulo jugal na base da asa anterior coincide com a asa posterior, levando-os a bater juntos. Em outras espécies de Lepidoptera, um frênulo na base da asa posterior pode exercer a função de um prendedor na asa (Klowden, 2013). Estudos sobre a capacidade de voo podem ser realizados em relação ao sexo, idade e habitat (Hughes & Dorn, 2002) do inseto adulto. Estudos como este permitem a avaliação da homogeneidade ou heterogeneidade da capacidade do voo dentro de uma população.

O voo exige uma grande quantidade de energia e os músculos de voo de insetos operam completamente aerobicamente. Apenas cerca de 10-20% do produto químico da energia utilizada para o voo é traduzida em energia mecânica, sendo o restante dissipada

como calor. Em alguns insetos este calor pode ser utilizado para a termorregulação, que lhes permite voar mesmo quando as temperaturas dos ambientes são muito baixas para a atividade muscular ideal (Nation, 2008).

O nível de ATP na musculatura do voo é suficiente para apenas cerca de 1 segundo de voo; uma reserva de fosfato de arginina, suficiente para um adicional de 2 a 4 segundo de voo pode ser rapidamente utilizado para sintetizar ATP (Nation, 2008). Este sistema é semelhante ao dos músculos de vertebrados, em que o fosfato de creatina pode ser usado como um reservatório para grupos fosforil de alta energia. O músculo também pode armazenar pequenas quantidades de outros combustíveis, incluindo prolina, glicogênio e triglicérides que são utilizados durante o voo, sendo esses recursos igualmente limitados (Nation, 2008).

O combustível para voos mais longos são gorduras armazenados no corpo e transportados para os músculos através da hemolinfa. Glicólise no músculo do voo do inseto ocorre muito parecida como em outros animais, com algumas adições. Em geral, os insetos que se envolvem em voos de longo alcance oxidam lipídios, enquanto que aqueles que usam carboidratos voam somente por períodos curtos. Em insetos com frequências de voo assíncrono, os músculos tendem a utilizar os hidratos de carbono, enquanto que aqueles com voo síncrono, os músculos são mais propensos a utilizar lipídios. Lipídio é a forma mais concentrada de armazenamento de energia (Klowden, 2013).

Lepidoptera é um grupo que inclui animais que diferem muito em tamanho e na frequência do bater de asas. Estudos indicam a existência de variações interessantes nos padrões de atividade do músculo em diferentes espécies deste grupo (Kammer, 1967). O primeiro estudo da atividade muscular durante o voo em Lepidoptera foi realizado por Roeder (1951). Ele mostrou que, no gênero de mariposa *Agrotis* há sincronia entre potencialidades musculares e movimentos laterais e que as contrações dos músculos são iniciadas pelo impulso motor e atividade alternada de músculos antagonistas, cronometrado pelo sistema nervoso. Este tipo de sistema de voo é chamado de neurogênico ou síncrono, em contraste para o sistema de voo miogênico ou assíncrono de moscas e vespas. No último caso, os movimentos da asa ocorrem com uma frequência maior do que as potencialidades musculares. Em Lepidoptera o mesotorax é maior do que o metatórax e é especialmente marcante a diferença entre os músculos longitudinais dorsais dos dois segmentos (Kammer, 1967).

Avaliações da atividade muscular das diferentes espécies predizem adaptações evolutivas e contribuem para a categorização das espécies quando a utilização dos recursos, estado do ambiente natural, mudanças de temperatura e até mesmo classificação.

Na presente Tese avaliamos o balaço oxidativo e bioquímico dos músculos do voo *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius besckei* e *Heliconius ethilla narcaea*. Estes parâmetros fisiológicos aliados à análise ultraestrutural das células musculares e da morfometria geométrica das asas das espécies citadas nos possibilitou a compreensão sobre as características fisiológicas das espécies envolvidas no par mimético no sul do Brasil. Nossa hipótese foi de que haveria semelhança entre os parâmetros fisiológicos e morfológicos (forma da asa) entre as espécies miméticas e divergente entre as espécies do mesmo clado (*H. besckei* e *H. e. narcaea*).

Canibalismo

Sendo as borboletas insetos herbívoros, quando comparadas a outros insetos, requerem uma dieta com uma alta proporção de proteína, devido ao seu crescimento rápido e à não-regulação da temperatura corporal. A fim de obter proteínas suficientes, os insetos herbívoros ingerem uma grande quantidade de alimentos e estes alimentos ingeridos passam pelo trato digestório muito rapidamente (Bernays, 1998). No entanto, alguns insetos herbívoros complementam suas dietas com itens não vegetais, tais como aqueles que proporcionam a proteína extra: ovos (Barros-Bellanda & Zucoloto, 2001) exúvia e outros animais, incluindo os da sua própria espécie (Bernays, 1998).

Apesar de não existir uma definição estrita de canibalismo, em geral refere-se à morte e ao consumo de parte ou de todo o indivíduo que é da mesma espécie (Elgar; & Crespi, 1992). Vários estudos já relataram o efeito da proteína de insetos sobre as variações no desenvolvimento e reprodução (Cresoni-Pereira & Zucoloto, 2001). O canibalismo apresenta vantagens como a obtenção de recurso alimentar, eliminação de um competidor em potencial e/ou predador coespecífico em potencial (Fox 1975 *apud* Richardson *et al.*2010). Os efeitos do canibalismo em uma população podem ser semelhantes aos de predação interespecífica, e tem o potencial de ser um regulador dependente da densidade do tamanho da população em muitas espécies, (Joyner, Gould & Carolina, 1985). Relacionado a taxa de canibalismo estão a quantidade e a qualidade

dos alimentos como fatores ambientais, sendo que vários estudos já reportaram que o canibalismo aumenta à medida que a abundância ou a qualidade nutricional do alimento diminui (Fox, 1975; Polis, 1981)

Os benefícios nutricionais do canibalismo são de dois tipos: acesso a uma fonte de energia que não é a mesma disponível a indivíduos não canibais e composição diferente de nutrientes que os conspecíficos podem ter em relação aos nutrientes das presas alternativas para a espécie. Sendo assim o canibalismo fornece nutrientes em diferentes proporções que tornam as dietas heteroespecíficas. Para animais que comem plantas, ocasionalmente a predação fornece uma refeição com maior relação nitrogênio e carbono do que a dieta normal a base de plantas. O comportamento canibalístico de alguns animais também pode provir de uma necessidade específica de proteína e não de fome (Ambrosen & Petersen, 1997).

Em lepidópteros, o aparelho bucal dos adultos é inadequado para a predação, de modo que o canibalismo é limitado a larvas sendo que mais velhas geralmente matam e consomem as mais jovens, (Richardson *et al.*, 2010). Também em borboletas é comum que os recém-nascidos consumam seus próprios córions após a eclosão para aproveitar a proteína, e este é apenas um pequeno impulso para o consumo de ovos não eclodidos (Barros-Bellanda & Zucoloto, 2001). O canibalismo do ovo é geralmente frequente quando os benefícios nutricionais o direcionam (Richardson *et al.*, 2010). Os ovos geralmente não tem defesas, são ricos em proteínas e lipídios e tem fácil digestibilidade. O córion consiste em uma proteína chamada de corionina. Experiências com lepidópteros mostraram que as lagartas jovens possuem grandes quantidades de proteínas e carboidratos (Barros-Bellanda & Zucoloto, 2001). Os tecidos animais geralmente contêm níveis mais altos de nutrientes do que as plantas e melhor equilíbrio de nutrientes. As lagartas recém eclodidas são frágeis e tem dificuldade de ingerir a folha quando não é fina e macia (Barros-Bellanda & Zucoloto, 2001) dessa forma torna viável como alternativa a ingestão do ovo, evitando o desgaste e ingerindo além de proteínas, uma grande quantidade de nitrogênio. Embora alguns ovos possuam defesas químicas contra a predação, estas são tipicamente ineficazes contra congêneres. O canibalismo serve para regular a densidade populacional em muitas espécies de lepidópteros o que pode beneficiar as larvas sobreviventes, conservando a qualidade das plantas hospedeiras ou reduzindo o número de inimigos naturais que são atraídos pelos voláteis dessas plantas hospedeiras (Richardson *et al.*, 2010).

Muitos autores comentam que as lagartas do primeiro *instar* de *Heliconius erato* podem comportar-se de forma canibalística em relação aos ovos (Brown & Mielke, 1972). O fim da temporada de voo das borboletas dessa espécie no Sul do Brasil, de maio a junho, é o período em que as plantas estão significativamente danificadas seja pelo comportamento das lagartas, seja pela mudança de temperatura; Nesse período as fêmeas podem facilitar o canibalismo, quando ovopositam muito próximo um ovo do outro (De Nardin & Mellender, 2011; De Nardin, Missaggia & Araújo, 2015). Isto ocorre principalmente em ambientes com número limitado de plantas, ou no fim do outono, quando há escassez de plantas; Em tais circunstâncias, o canibalismo pode ocorrer. O comportamento da ovoposição em *H. erato phyllis* é a inspeção cuidadosa da planta, o que sugere que esse mecanismo é uma forma de evitar a ovoposição onde está presente outro ovo (Benson, Brown & Gilbert, 1975; Brown, 1981). As larvas de primeiro instar são bastante agressivas, o que provavelmente ocorre por conta de sua vulnerabilidade frente ao ambiente. Alguns autores argumentam que as diferenças positivas na aptidão dos indivíduos que foram canibais na fase larval é resultado da ingestão de proteína contida nos ovos, que sendo diferente da contida em outra dieta alternativa, seriam mais facilmente assimiladas. (Bayoumy & Michaud, 2015; De Nardin *et al.*, 2015).

Estresse ambiental: Temperatura

No ambiente, qualquer organismo é confrontado com o estresse, causado por condições ambientes flutuantes ou mudanças e distúrbios causados pelo homem e pela poluição. Esse estresse pode ser prejudicial à vida, exibindo efeitos adversos em diferentes níveis de organização, como populações, organismos individuais, tecidos e células. Os efeitos podem ser detectados em traços da história de vida de um organismo, como por exemplo, o desenvolvimento, crescimento, envelhecimento, longevidade, sobrevivência e reprodução.

O estresse surge quando algum fator ambiental causa mudanças que leva um organismo a se distanciar do seu nicho. Do lado de fora do seu nicho, o organismo não pode crescer e se reproduzir, mas pode sobreviver, embora muitas vezes temporariamente. Existem opções para aliviar o estresse, a primeira é voltar ao nicho usando mecanismos comportamentais ou suprimindo o estressor e a segunda é alterar os limites do nicho por adaptação genética (Korsloot, *et al* 2004).

Uma espécie com ampla amplitude pode consistir de várias populações locais, cada uma com uma amplitude. Consequentemente, o que é estresse para uma população pode ser normal para outra população da mesma espécie. Além disso, mesmo a mesma população pode abrigar genótipos que têm diferentes formas de lidar com o estresse. Em uma população polimórfica a seleção natural pode favorecer uma forma particular com o estresse sobre as outras e, assim, alterar a composição genética da população. Em última análise, a resposta de uma população ao estresse pode ser designada adaptação genética. O estudo de tais adaptações é muito importante na ecologia evolutiva e na fisiologia (Feder & Walser, 2005). As consequências secundárias da adaptação muitas vezes podem ser consideradas *trade-offs*, pois representam custos metabólicos a fim de lidar permanentemente com o estresse.

O estresse ambiental pode ter um impacto sobre os processos evolutivos e ecológicos que afetam e modulam a estrutura genética e a evolução das populações, conforme indicado pelos dados obtidos nas décadas de 1940 e 1950 com *Drosophila* pelos pesquisadores Timofeeff-Ressovsky e Dobzhansky. As investigações deles levaram a um aumento do interesse em estudar o papel do estresse ambiental em relação à seleção natural para resistência ao estresse e adaptação.

Em um sentido geral, a adaptação pode ser definida como o processo de mudança em um organismo para que este se conforme melhor com as novas condições ambientais. O organismo adquire características envolvendo alterações na morfologia, fisiologia ou comportamento e melhora na sua sobrevivência e/ou sucesso reprodutivo em determinado ambiente. Tais mudanças podem ocorrer fenotipicamente, dentro de um genótipo definido, e então a adaptação fenotípica é o resultado do que se chama plasticidade. Dessa forma existe então a capacidade de um fenótipo modificar de acordo com as condições ambientais prevalentes e sofrer alterações morfológicas e de outras formas.

A temperatura como um estressor ambiental irá fazer com que os organismos exibam seus efeitos adversos em diferentes níveis de organização, tais como populações, organismos, tecidos e células. No nível individual, esses efeitos são evidenciados nos traços de história de vida, como o desenvolvimento, crescimento, envelhecimento, longevidade, sobrevivência e reprodução. No entanto, qualquer que seja o nível de exposição dos danos ou a característica afetada, o ataque básico e as

alterações fisiológicas subsequentes ocorrem nas células dos organismos (Korsloot *et al.*, 2004).

REFERÊNCIAS

- Ambrosen, T. & Petersen, V.E. (1997). The influence of protein level in the diet on cannibalism and quality of plumage of layers. *Poult. Sci.* **76**, 559–563.
- Anand, A.N. & Lorenz, M.W. (2008). Age-dependent changes of fat body stores and the regulation of fat body lipid synthesis and mobilisation by adipokinetic hormone in the last larval instar of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* **54**, 1404–1412.
- Athenstaedt, K. & Daum, G. (2006). The life cycle of neutral lipids: Synthesis, storage and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1355–1369.
- Barja, G. (2007). Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: Implications for Aging Studies. *Rejuvenation Res.* **10**, 215–224.
- Barros-Bellanda, H.C.H. & Zucoloto, F.S. (2001). Influence of chorion ingestion on the performance of *Ascia monuste* and its association with cannibalism. *Ecol. Entomol.* **26**, 557–561.
- Bates, H.W. (1862). XXXII. Contributions to an Insect Fauna of the Amazon Valley. Lepidoptera: Heliconidæ. *Trans. Linn. Soc. London* **23**, 495–566.
- Bayoumy, M.H. & Michaud, J.P. (2015). Egg Cannibalism and Its Life History Consequences Vary with Life Stage, Sex, and Reproductive Status in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Econ. Entomol.* **108**, 1665–1674.
- Benson, W.W., Brown, K.S., & Gilbert, L.E. (1975). Coevolution of Plants and Herbivores: Passion Flower Butterflies. Author(s): Woodruff W. Benson, Keith S. Brown, Jr. and Lawrence E. Gilbert. Published by: Society for the Study of Evolution. Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2407076>. Access. *Evolution (N. Y.)*. **29**, 659–680.
- Benson, W.W. (1972). Natural selection for Mullerian mimicry in *Heliconius erato* in Costa Rica. *Science (80-)*. **176**, 936–939.
- Benzie, I.F.F. (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **47**, 233–262.
- Bernays, E.A. (1998). Evolution of insect feeding behavior in herbivores: success seen as different ways to eat without being eaten. *Bioscience* **48**, 35–44.
- Brower, A.V.Z. (1997). The evolution of ecologically important characters in *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): A cladistic review. *Zool. J. Linn. Soc.* **119**, 457–472.
- Brown, K.S. (1981). The Biology of *Heliconius* and Related Genera. *Annu. Rev. Entomol.* **26**, 427–457.
- Brown, K.S.J. & Mielke, O.H.H. (1972). The Heliconians of Brazil (Lepidoptera Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary revision of the tribe.
- Cardoso, M.Z. (2005). New Localities for *Heliconius besckei* Ménétriés and *Heliconius sara* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) in Bahia, Brazil. *Neotrop.*

- Entomol.* **34**, 1007–1008.
- Cardoso, M.Z. & Gilbert, L.E. (2007). A male gift to its partner? Cyanogenic glycosides in the spermatophore of longwing butterflies (Heliconius). *Naturwissenschaften* **94**, 39–42.
- Chauhan, R., Jones, R., Wilkinson, P., Pauchet, Y. & Ffrench-Constant, R.H. (2013). Cytochrome P450-encoding genes from the Heliconius genome as candidates for cyanogenesis. *Insect Mol. Biol.* **22**, 532–540.
- Cresoni-Pereira, C. & Zucoloto, F.S. (2001). Influence of quantities of brewer yeast on the performance of *Anastrepha obliqua* wild females (Diptera, Tephritidae). *Iheringia. Série Zool.* **129**, 53–60.
- Dickinson, B.C. & Chang, C.J. (2011). Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species in Signaling or Stress Responses. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 504–511.
- Elias, M., Gompert, Z., Jiggins, C. & Willmott, K. (2008). Mutualistic Interactions Drive Ecological Niche Convergence in a Diverse Butterfly Community. *PLOS Biol.* **6**, 1.
- Engler-Chaouat, H.S. & Gilbert, L.E. (2007). De novo synthesis vs. sequestration: Negatively correlated metabolic traits and the evolution of host plant specialization in cyanogenic butterflies. *J. Chem. Ecol.* **33**, 25–42.
- Engler, H.S., Spencer, K.C. & Gilbert, L.E. (2000). Preventing cyanide release from leaves. *Nature* **406**, 144–145.
- Feder, M.E. & Walser, J.C. (2005). The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. *J. Evol. Biol.* **18**, 901–910.
- Felton, G.W. & Summers, C.B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **29**, 187–197.
- Fox, L.R. (1975). Cannibalism in natural populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **6**, 87–106.
- Gilbert, L.E. (1972). Pollen feeding and reproductive biology of heliconius butterflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 1403–1407.
- Gille, G. & Sigler, K. (1995). Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol. (Praha)*. **40**, 131–152.
- Hahn, D.A. & Denlinger, D.L. (2007). Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. *J. Insect Physiol.* **53**, 760–773.
- Harrison, J.F. (2015). Handling and use of oxygen by pancrustaceans: Conserved patterns and the evolution of respiratory structures. *Integr. Comp. Biol.* **55**, 802–815.
- Hogg, N. & Kalyanaraman, B. (1999). Nitric Oxide and Lipid Peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1411**, 378–384.
- Hughes, J. & Dorn, S. (2002). Sexual differences in the flight performance of the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. *Entomol. Exp. Appl.* **103**, 171–182.
- Jones, D.P. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1–16.
- Joron, M., Jiggins, C.D., Papanicolaou, A. & McMillan, W.O. (2006). Heliconius wing patterns: an evo-devo model for understanding phenotypic diversity. *Heredity (Edinb)*. **97**, 157–167.
- Joyner, K., Gould, F. & Carolina, N. (1985). Developmental Consequences of Cannibalism in *Heliothis zea* (Lepidoptera : Noctuidae) 24–28.
- Kammer, B.Y.A.N.N.E. (1967). MUSCLE ACTIVITY DURING FLIGHT IN SOME LARGE LEPIDOPTERA. *J. Exp. Biol.* **47**, 277–295.
- Kapan, D.D. (2001). Three-butterfly system provides a field test of mullerian mimicry.

Nature **409**, 338–340.

- Klowden, M. (2013). *Physiological Systems in Insects*. Academic Press.
- Korayem, A.M., Khodairy, M.M. & El-sonbaty, A. a M. (2012). The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee , *Apis mellifera* during two different seasons. *J. Biol. Earth Sci.* **2**, B93–B109.
- Kozak, K.M., Wahlberg, N., Neild, A.F.E., Dasmahapatra, K.K., Mallet, J. & Jiggins, C.D. (2015). Multilocus species trees show the recent adaptive radiation of the mimetic heliconius butterflies. *Syst. Biol.* **64**, 505–524.
- Langham, G.M. (2004). Specialized avian predators repeatedly attack novel color morphs of *Heliconius* butterflies. *Evolution (N. Y.)* **58**, 2783–2787.
- Lee, C.S., McCool, B.A., Moore, J.L., Hillis, D.M. & Gilbert, L.E. (1992). Phylogenetic Study of Heliconiine Butterflies Based On Morphology and Restriction Analysis of Ribosomal-Rna Genes. *Zool. J. Linn. Soc.* **106**, 17–31.
- Listowsky, I., Abramovitz, M., Homma, H. & Niitsu, Y. (1988). Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferase. *Drug Metab. Rev.* **19**, 305–318.
- Llaurens, V., Joron, M. & Théry, M. (2014). Cryptic differences in colour among Müllerian mimics: how can the visual capacities of predators and prey shape the evolution of wing colours? *J. Evol. Biol.* **27**, 531–540.
- Lockey, K.H. (1988). Lipids of the Insect Cuticle : **89**, 595–645.
- Lorenz, M.W. & Anand, A.N. (2004). Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **56**, 110–119.
- Lushchak, V.I. & Lushchak, V.I. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J. Amino Acids* **2012**, 1–26.
- Mallet, J. (1999). Causes and consequences of a lack of coevolution in Mullerian mimicry. *Evol. Ecol.* **13**, 777–806.
- Mallet, J., Beltrán, M., Neukirchen, W. & Linares, M. (2007). Natural hybridization in heliconiine butterflies: The species boundary as a continuum. *BMC Evol. Biol.* **7**, 1–16.
- Mallet, J. & Gilbert, L. (1995). Why are there so many mimicry rings? Correlations between habitat, behaviour and mimicry in *Heliconius* butterflies. *Biol. J. Linn. Soc.* **55**, 159–180.
- Mallet, J., Jiggins, C.D. & McMillan, O.W. (1998). Mimicry and warning colour at the boundary between races and species. *Endless forms. Species Speciat.* 390–403.
- Mannervik, B., Board, P.G., Hayes, J.D., Listowsky, I. & Pearson, W.R. (2005). Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol.* **401**, 1–8.
- Mayntz, D. & Toft, S. (2006). Nutritional value of cannibalism and the role of starvation and nutrient imbalance for cannibalistic tendencies in a generalist predator. *J. Anim. Ecol.* **75**, 288–297.
- Mendes, A.M., Schlegelmilch, T., Cohuet, A., Awono-Ambene, P., De Iorio, M., Fontenille, D., Morlais, I., Christophides, G.K., Kafatos, F.C. & Vlachou, D. (2008). Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa. *PLoS Pathog.* **4**.
- Merrill, R.M., Dasmahapatra, K.K., Davey, J.W., Dell’Aglia, D.D., Hanly, J.J., Huber, B., Jiggins, C.D., Joron, M., Kozak, K.M., Llaurens, V., Martin, S.H.,

- Montgomery, S.H., Morris, J., Nadeau, N.J., Pinharanda, A.L., Rosser, N., Thompson, M.J., Vanjari, S., Wallbank, R.W.R. & Yu, Q. (2015). The diversification of Heliconius butterflies: What have we learned in 150 years? *J. Evol. Biol.* **28**, 1417–1438.
- De Nardin, J. & Mellender, A. (2011). Kin recognition in immatures of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *J. Ethol.* **29**, 499–503.
- De Nardin, J., Missaggia, B.O. & Araújo, A.M. (2015). An experimental approach to test the source of information on kinship in butterfly immatures. *Ethol. Ecol. Evol.* **27**, 294–305.
- Nation, J. (2008). *Insect Physiology and Biochemistry*.
- Pamplona, R. & Costantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**, R843–R863.
- Penz, C.M. (1999). Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. *Zool. J. Linn. Soc.* **127**, 277–344.
- Polis, G.A. (1981). The evolution and dynamics of intraspecific predation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **12**, 225–251.
- Richardson, M.L., Mitchell, R.F., Reagel, P.F. & Hanks, L.M. (2010). Causes and consequences of cannibalism in noncarnivorous insects. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 39–53.
- Ruxton, G.D., Sherratt, T.N. & Speed, M.P. (2004). Avoiding Attack: The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry. *Oxford Biol.* **17**, 249.
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology* 2018, **7**, 122–126.
- Soulages, E.L.A. and J.L. (2010). Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 207–225.
- Souza, A.V.G., Petretski, J.H., Demasi, M., Bechara, E.J.H. & Oliveira, P.L. (1996). Urate protects a blood-sucking insect against hemin-induced oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 209–214.
- Srivastava, P. & Gupta, P.D. (1961). EXCRETION OF URIC ACID IN. *J. Insect Physiol.* **6**, 136–167.
- Storey, K.B. (1997). Organic Solutes in Freezing Tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **117**, 319–326.
- Stuckert, A.M.M., Venegas, P.J. & Summers, K. (2014). Experimental evidence for predator learning and Müllerian mimicry in Peruvian poison frogs (*Ranitomeya*, Dendrobatidae). *Evol. Ecol.* **28**, 413–426.
- Timmermann, S.E. & Briegel, H. (1999). Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* **45**, 461–470.
- Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F. & Okuda, T. (2002). Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *J. Exp. Biol.* **205**, 2799–2802.
- Ziegler, R. (1991). Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. B.* **161**, 125–31.
- Ziegler, R. & Van Antwerpen, R. (2006). Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 264–272.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros ecofisiológicos associadas à evolução do mimetismo apresentadas por duas das três espécies do gênero *Heliconius* (*H.besckei*, *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Avaliar o metabolismo energético, o estresse oxidativo e a ultraestrutura histológica dos músculos de voo das espécies *H. erato phyllis*, *H. besckei* e *H. ethilla narcaea*.

Capítulo 1

B) Avaliar a convergência na forma e tamanho da asa das três espécies mencionadas no item anterior. **Capítulo 2**

C) Avaliar o metabolismo energético e o balanço oxidativo durante o desenvolvimento de indivíduos de *H. erato phyllis* canibais e não canibais. **Capítulo 3**

D) Avaliar as diferenças no metabolismo energético e balanço oxidativo em lagartas de *Heliconius ethilla narcaea* criadas em diferentes temperaturas. **Capítulo 4**

COMENTÁRIO DA AUTORA

Cada capítulo da presente tese teve regras de formatação específicas para o periódico que será submetido. As regras relacionadas à posição de figuras e legendas são distintas daquelas impostas pelo periódico para facilitar a leitura da Banca.

Periódico	Url de acesso às normas
<i>Journal of Insect Physiology</i>	https://tinyurl.com/j-insect-phy
<i>Biological Journal of the Linnean Society</i>	https://tinyurl.com/bj-lins
<i>Entomological Science</i>	https://tinyurl.com/entomsci
<i>Physiological Entomology</i>	https://tinyurl.com/phyentom

CAPÍTULO 1

Manuscrito redigido conforme as normas do periódico *Journal of Insect Physiology*

**Marcadores bioquímicos e ultraestruturais relacionados ao voo de borboletas
Heliconius do sul do Brasil**

Tiziane Fernandes Molina¹, Aldo Mellender Araújo², Léder Leal Xavier³, Artur Navarro Valgas⁴, Guendalina Turcato Oliveira^{1*}

1 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Escola de Ciências. Programa de Pós Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade. Avenida Ipiranga, 6 6681, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

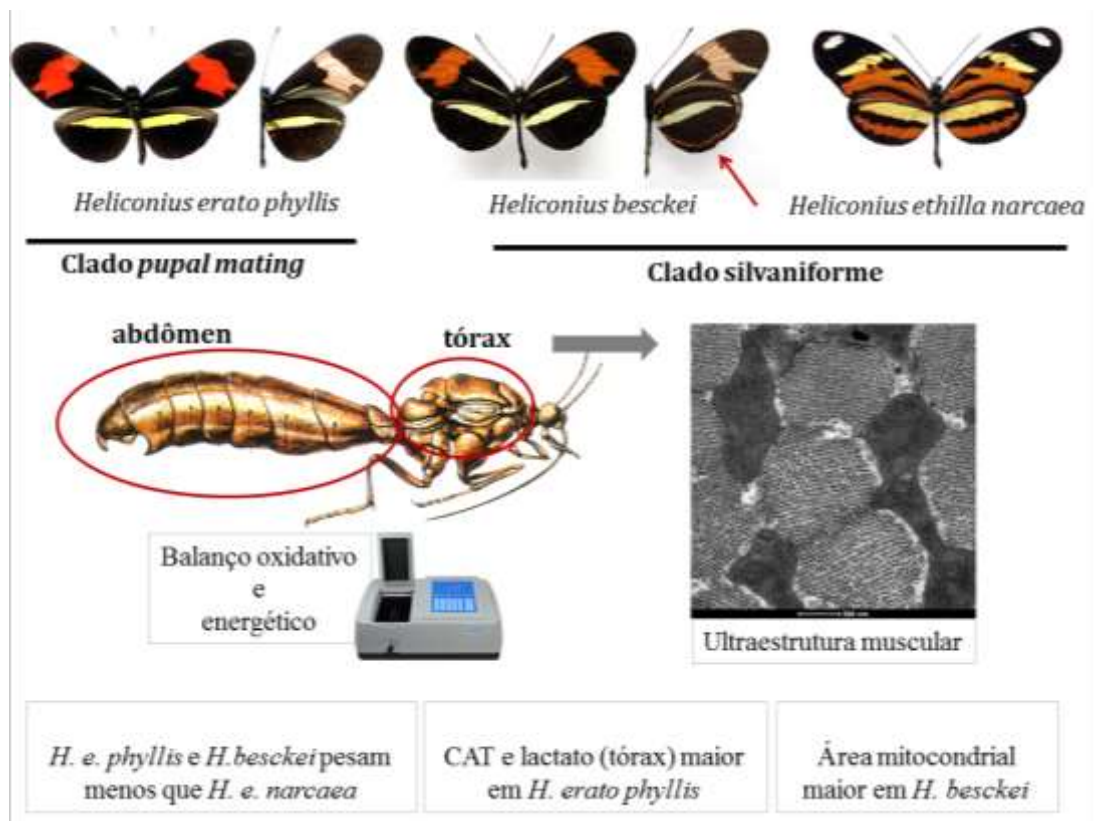
2 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Genética. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Avenida Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

3 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Escola de Ciências. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Avenida Ipiranga, 6 6681, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

4 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Zoologia. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal. Avenida Bento Gonçalves, 9500, 90650-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

* Autor correspondente: guendato@pucrs.br

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

O mimetismo entre espécies de *Heliconius* pode ser reforçado por outras características além da coloração de asas. Essas características podem estar relacionadas a funcionalidade do voo contribuindo para que o predador reconheça a espécie impalatável antes mesmo de ver a coloração das asas. A funcionalidade e o tipo de voo são estabelecidos através de inúmeros parâmetros fisiológicos. Neste trabalho nós avaliamos os marcadores bioquímicos do metabolismo energético e do balanço oxidativo em tórax e abdômen de três espécies de *Heliconius* do sul do Brasil (*H. erato phyllis*, *H. besckei* e *H. ethilla narcaea*). Analisamos também ultraestrutura muscular do tórax destas espécies. Nosso objetivo era investigar se estes parâmetros fisiológicos relacionados ao voo são semelhantes entre o par mimético formado pela espécie do clado de acasalamento pupal e pela espécie do clado silvaniforme. Os resultados obtidos nos mostram convergência entre as massas corporais de tórax e abdômen entre as miméticas, diferindo assim de *H. e. narcaea* do clado silvaniforme. Além disso os marcadores do balanço oxidativo (TBARS, SOD e GST) e do metabolismo intermediário (proteínas totais, lipídios totais, triglicerídeos, colesterol e glicogênio) também mantiveram a mesma semelhança entre o par mimético. Contudo, devido às restrições à ambientes de altitudes maiores que 700m, algumas exigências fisiológicas de *H. besckei* parecem mais dispendiosas fazendo com que algumas características a diferencie das outras espécies. Parâmetros estes de área mitocondrial, atividade da catalase e os níveis de ácido úrico e lactato

Palavras-chave: mimetismo, mitocôndrias, *H. besckei*, balanço oxidativo e energético

1.1 INTRODUÇÃO

O voo é importante para a aptidão da maioria dos insetos devido a sua função na dispersão, forrageamento e reprodução (Gibbs & Dyck, 2016). No entanto, apesar de sabermos que a capacidade de voo está relacionada com a manutenção das atividades diárias básicas, os mecanismos fisiológicos correspondentes não são bem compreendidos na maioria dos insetos (Rauhamäki et al., 2014).

A atividade de voo exige uma grande quantidade de energia e os músculos de voo dos insetos operam aerobicamente. O nível de ATP na musculatura do voo da maioria destes organismos é suficiente para apenas um segundo de voo, no entanto, as reservas de fosfato de arginina são acionadas rapidamente para a síntese de mais ATP, o que adiciona de 2 a 4 segundos (Nation, 2008). Os músculos também armazenam pequenas quantidades de outros combustíveis, incluindo prolina, glicogênio e triglicerídeos. Estes também são utilizados, apesar de apresentarem recursos limitados.

O combustível para voos mais longos são os lipídios armazenadas no corpo e transportadas para os músculos através da hemolinfa. Em geral, os insetos que voam longas distâncias oxidam lipídios, enquanto que aqueles que usam carboidratos voam por períodos curtos. A frequência de voo síncrono, característico das borboletas, faz com que os músculos destas sejam mais propensos a utilizar lipídios (Klowden, 2013).

Lepidoptera é um grupo que inclui espécies que diferem muito no tamanho e na frequência do bater de asas, assim como também apresentam variações nos padrões de atividade dos músculos (Kammer, 1967). O voo dos lepidópteros é descrito como uma forma energeticamente cara de locomoção (Zera & Denno, 1997). As taxas metabólicas desses organismos em voo podem ser 170 vezes maiores do que se o animal estivesse em repouso. Para reabastecer seus músculos de voo, os lepidópteros que se alimentam de néctar (água e carboidratos, principalmente) o metabolizam logo após a ingestão para

utilizar os carboidratos e lipídios nas suas atividades. Dessa forma, recorrem as suas reservas de gordura somente quando estão famintos e a procura de alimento (Klowden, 2013; Levin et al., 2017).

A atividade intensa do voo aeróbico nesses músculos produz espécies reativas de oxigênio (EROs). Essa produção ocorre nas mitocôndrias durante a síntese de ATP e pode, em excesso, causar danos oxidativos nos miócitos em contração (Powers & Jackson, 2008). O sistema antioxidante é composto por componentes enzimáticos e não enzimáticos que atenuam os danos oxidativos. As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) (enzima de detoxificação) auxiliam na metabolização dos compostos radicais que o organismo elabora quando em alta atividade metabólica. O sistema antioxidante não enzimático é representado por moléculas de baixo massa-molecular de origem exógena, como as vitaminas (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, entre outras), e endógenas como a glutathione (GSH), a melatonina, o ácido úrico, entre outras (Pamplona & Costantini, 2011).

Em várias espécies de insetos o desempenho do voo é fortemente relacionado com os indicadores de capacidade dos músculos do voo, como a respiração, tamanho e concentração mitocondrial (Rauhamäki et al., 2014). A maioria dos estudos sobre voo em Lepidoptera se refere à velocidade e a dinâmica (Altizer & Davis, 2009; Dudley & Srygley, 1994; Srygley & Ellington, 1999), enquanto poucos são os que se dedicaram a investigar o metabolismo do voo (Levin et al., 2017; Mattila, 2015; Rauhamäki et al., 2014). Já quanto ao gênero de borboletas *Heliconius* não existe nenhum dado publicado acerca da fisiologia do voo.

Neste trabalho nós investigamos três espécies de borboletas do gênero *Heliconius* que ocorrem no sul do Brasil. Nosso interesse com é de aprofundar os conhecimentos sobre o mimetismo que ocorre em duas destas espécies. A espécie

Heliconius erato phyllis, que pertencente ao clado *pupal mating* e *Heliconius besckei* pertencente ao clado silvaniforme formam um par mimético na região sul do Brasil. Elas podem ser simpátricas em determinadas localidades com *Heliconius ethilla narcaea*, que apesar de pertencer ao mesmo clado que *H. besckei* apresenta padrão de coloração da asa distinto.

Nossa hipótese é de que o mimetismo estabelecido pela coloração das asas se estende também para outros níveis do organismo, como a estrutura das células musculares (mitocôndrias e miofibrilas) e nos níveis dos marcadores de metabolismo energético e de balanço oxidativo. Estes indicadores bioquímicos são importantes para avaliar a capacidade aeróbica de espécies que ainda não se conhece bem a capacidade de dispersão na natureza, como *Heliconius besckei*, por exemplo.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Borboletas

Os indivíduos foram coletados nos anos de 2016 e 2017 na primavera e verão em São Francisco de Paula, Estado do Rio Grande do Sul e transportados vivos, mantendo-se o ambiente refrigerado para minimizar o estresse, até o laboratório de Genética Ecológica, onde foram crioeutanasiados e pesados. Foram retiradas as cabeças, as asas e separados os tórax e abdomens de machos e fêmeas. As análises dos parâmetros metabólicos e do balanço oxidativo foram realizadas utilizando *pools* de dois ou três tórax ou abdomens de machos e de fêmeas.

1.2.2 Análise ultraestrutural dos músculos do voo por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Para a aplicação da metodologia de microscopia eletrônica de transmissão foi feita a dissecação dos tórax em placa de Petri contendo solução fixadora de Karnovsky. Foram retirados os feixes musculares correspondentes aos músculos do voo. Os tórax usados para a dissecação não foram utilizados em outras análises. Foram utilizados três indivíduos de *H. besckei*, seis de *H. erato phyllis* e quatro de *H. ethilla narcaea* para a separação dos tórax e retirada dos feixes musculares. Os feixes musculares foram armazenados em Eppendorfs em solução fixadora. Foram realizadas as lavagens com tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) e a pós-fixação com tetróxido de ósmio 2% e tampão fosfato 0,2M. A desidratação foi realizada com acetona antes da pré-embebição e embebição em resina. A inclusão foi feita com moldes de silicone com resina pura, em estufa com temperatura constante de 60°C por 72 horas. Secções ultrafinas (70 nm) foram coradas com 2% de acetato de uranila seguido de citrato de chumbo (Martins et al., 2015). A análise ultraestrutural foi realizada utilizando o *software* Image Pro Plus (versão 6.1, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). As análises foram realizadas por um especialista cegado em análise de imagens, morfometria, estereologia planar e em relação ao grupo de origem das imagens. As avaliações morfológicas utilizando as imagens de TEM seguem conforme descrito a seguir.

1.2.3 Densidade mitocondrial e de miofibrilas

Para estimar as densidades de mitocôndrias e de miofibrilas foi realizada uma análise quantitativa similar à câmara de Neubauer, onde quadrados medindo $33,5\mu\text{m}^2$, denominados áreas de interesse (AOIs), foram sobrepostos aleatoriamente em imagens de 2600x, e mitocôndrias e miofibrilas localizadas dentro de cada quadrado ou

intersectados pelas bordas superior e/ou esquerda dos quadrados foram contadas. As mitocôndrias e miofibrilas interceptadas pelas bordas inferior e/ou direita dos quadrados não foram contadas (De Senna et al., 2017; Lima et al., 2018). Em média, três AOIs foram analisadas em cada imagem e 15 imagens foram analisadas por indivíduo.

1.2.4 Área mitocondrial

A área total coberta por mitocôndrias e área individual mitocondrial foram calculadas utilizando-se uma ferramenta estereológica, o método de contagem de pontos (Lima et al., 2018; Rucatti et al., 2015). Uma grade de cruzamentos com intervalos equidistantes (*grid mask*) com valor de área ponto de $4\mu\text{m}^2$ foi colocada sobre imagens. Quando o quadrante superior direito da cruz atingiu imagens de mitocôndrias, estas eram contadas. A área individual das mitocôndrias foi obtida através do delineamento da mitocôndria com o auxílio do *software* Image Pro Plus. Foram utilizadas em média 15 imagens para cada análise por indivíduo, sendo que para a estimativa da área mitocondrial foram circuladas três mitocôndrias em cada imagem.

1.2.5 Análise da escala de cinza mitocondrial

A densidade de elétrons das mitocôndrias foi medida usando análise de escala de cinza (Xavier et al., 2005). As mesmas imagens que utilizamos para a estimativa da área mitocondrial foram utilizadas para esta análise (0-255 tons de cinza). O *software* de análise de imagem determina a intensidade de tons de cinza das AOIs com base nos pixels das imagens digitalizadas. Sendo assim, zero é igual a preto absoluto e 255 é igual a branco absoluto. Um aumento na escala de cinza indica menor densidade de elétrons que se relaciona com a perda de cristas mitocondriais.

1.2.6 Forma mitocondrial Z

O coeficiente de forma ou *Shape Z* foi utilizado para determinar a forma das mitocôndrias (García-Fiñana et al., 2003; Lima et al., 2018). Esta medida é obtida utilizando a equação: $Shape\ Z = P / \sqrt{A}$, onde *Shape Z* é o coeficiente da forma, P que é o perímetro da mitocôndria, sendo este dividido pela raiz quadrada da área da mitocôndria. As mesmas imagens que foram usadas para estimar a área mitocondrial foram utilizadas para o cálculo do *Shape Z*. Valores de *Shape Z* baixos indicam uma mitocôndria mais arredondada, enquanto os valores mais altos indicam mitocôndrias mais alongadas.

1.2.7 Análises do balanço oxidativo

O balanço oxidativo foi obtido através das determinações de TBARS, enzimas, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) da mesma forma que ocorreu para o metabolismo energético, com *pools* separados de tórax e abdômens de machos e fêmeas. Estes foram organizados em *pools*, três *pools* de tórax de *H. besckei*, cinco para *H. erato phyllis* e seis para *H. ethilla narcaea* com total de 28 tórax coletados. Para os abdômens utilizamos três *pools* de *H. besckei*, cinco de *H. erato phyllis* e seis de *Heliconius ethilla narcaea* com total de 26 abdomen utilizados nas análises. Para abdômens foram 4 *pools* de *H. erato phyllis*, seis de *H. ethilla narcaea* e três de *H. besckei*. O ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizado para a determinação da lipoperoxidação (LPO), sendo esta técnica utilizada para medir o nível de dano aos lipídios da membrana, já que o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos. A determinação segue modificações baseadas na descrição feita por Lima & Abdalla, (2001). A concentração de TBARS está expressa em $\mu\text{moles.mg de proteínas}^{-1}$. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo descrito por Boveris et al., (1983), expressa em unidade de mg por proteína por minuto. A unidade corresponde a

quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector utilizado, neste caso a epinefrina. A atividade da enzima catalase foi medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio (Boveris & Chance, 1973). Sendo assim, a decomposição do peróxido de hidrogênio é proporcional a atividade da catalase. Os resultados estão expressos em $\mu\text{moles}\cdot\text{minuto}^{-1}\cdot\text{mg de proteínas}^{-1}$. A atividade da glutathione S-transferase foi medida de acordo com método descrito por Boyland & Chasseaud, (1969) e expressa em $\mu\text{moles}\cdot\text{minuto}^{-1}\cdot\text{mg de proteínas}^{-1}$.

1.2.8 Análises do metabolismo energético

As análises dos biomarcadores de metabolismo energético envolveram a avaliação dos níveis de ácido úrico, proteínas, lactato e glicogênio para pools de tórax e abdômens, separadamente de machos e fêmeas, estes mesmos procedimentos da mesma forma que ocorreu para triglicerídeos, lipídios e colesterol. Utilizamos para as análises de Proteínas totais, ácido úrico, glicogênio e lactato, o número de quatro *pools* de tórax de *H. besckei*, sete de *H. erato phyllis* e sete de *H. ethilla narcaea*. Sendo cada *pool* composto de dois tórax, totalizando 36 indivíduos. A mesma análise foi realizada em abdômens organizados em quatro pools de *H. besckei*, seis de *H. erato phyllis* e seis de *H. ethilla narcaea*, totalizando 32 abdômens utilizados nesta análise. Para as análises de lipídios, triglicerídeos e colesterol utilizamos cinco *pools* de tórax de *H. erato phyllis*, seis de *H. ethilla narcaea* e três de *H. besckei*, totalizando 28 tórax. Utilizamos 32 abdômens divididos em sete pool de *H. erato phyllis*, seis para *H. ethilla narcaea* e três de *H. besckei*.

A extração do glicogênio seguiu o método de (Handel, 1965) e quantificação como glicólise após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (Na_2CO_3) utilizando-se o *kit* de glicose da Biotécnica para o método da oxidação da glicose através da enzima

glicose oxidase. As proteínas foram quantificadas através do *kit* de proteínas da Biotécnica. Segundo o método do *kit*, a proteína reage com íons de cobre em meio alcalino, originando um complexo de cor violáceo cuja absorbância é proporcional à concentração da amostra. O ácido úrico foi determinado através do *kit* da Biotécnica (Ácido Úrico Biotécnica). O Ácido úrico da amostra sofre a ação da uricase, na presença de oxigênio, produzindo alantoína e peróxido de hidrogênio, este, em presença de um reagente fenólico (DHBS) e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase produzindo um composto rosa. O lactado também foi determinado de acordo com o *Kit* da Biotécnica. O lactato da amostra sofre a ação da enzima lactato oxidase, na presença de oxigênio, produzindo piruvato e peróxido de hidrogênio. Este, em presença de um reagente fenólico (TOOS) e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase produzindo um cromógeno violáceo. Os lipídios, triglicerídeos e colesterol teciduais foram extraídos pelo método do clorofórmio e metanol na proporção 2:1, segundo o método de Folch et al.,(1957).

A dosagem de lipídios totais se deu conforme o método descrito por Frings & Dunn, (1970) e a do colesterol total conforme o *kit* da Biotécnica (Colesterol Total Biotécnica). Os ésteres de colesterol existentes na amostra são hidrolisados pela enzima colesterol esterase produzindo o colesterol livre que é catalisado pela colesterol oxidase produzindo o peróxido de hidrogênio. Os triglicerídeos tiveram dosagem determinada através do *kit* da Biotécnica (Triglicérides Biotécnica). A enzima lipase lipoproteica hidrolisa os triglicerídios existentes na amostra, produzindo glicerol livre. A enzima glicerolquinase catalisa a fosforilação do glicerol livre pelo ATP formando glicerol-3-fosfato que em presença do oxigênio sob ação catalítica da enzima Glicerol-P-oxidase, produz peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a oxidação do reagente 4-

clorofenol pelo peróxido de hidrogênio formado em presença de 4-aminoantipirina, produzindo um composto rosa. Todos os resultados foram expressos em mg/g.

1.2.9 Análises estatísticas

A análise estatística da ultraestrutura da musculatura do voo foi realizada através de Anova univariada, com teste complementar de Bonferroni após testarmos as diferenças entre sexos através de Teste t ou Mann-Whitney. Somente para a área mitocondrial os dados não mostraram distribuição normal; dessa forma utilizamos Kruskal Wallis com teste complementar de Dunn.

Para os biomarcadores do balanço oxidativo e do metabolismo intermediário foram realizadas primeiramente os testes entre tórax e abdomens de cada sexo sobre a mesma espécie através de Teste t ou Mann-Whitney conforme o valor do teste de normalidade de Shapiro Wilk conforme normalidade indicou segundo Shapiro Wilk. Dado que nossos resultados não mostraram diferença significativa entre os sexos, estes foram agrupados para a realização dos testes entre as três espécies. Conforme normalidade dos dados de balanço oxidativo, realizamos MANOVA para os fatores fixos de espécie e de tecido (tórax e abdomen) e variáveis dependentes TBARS, SOD, CAT e GST com teste complementar de Bonferroni. Para os dados não normais dos biomarcadores de metabolismo intermediário utilizamos Kruskal Wallis, com teste complementar de Dunn. Os testes estatísticos foram realizados no Programa SPSS e no Bioestat. Os valores de significância bem como o número amostral utilizado em cada teste constam na Tabela 1.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Mitocôndrias e miofibrilas dos músculos do voo

Como machos e fêmeas não diferiram significativamente para todas as variáveis analisadas, nas três espécies, eles foram agrupados nas análises subsequentes. A Figura 1D mostra os resultados para as análises de área mitocondrial (μm^2) nas três espécies, bem como para o parâmetro *shape-Z*. Como se pode ver, *H. besckei* apresenta a maior área, com diferença significativa em relação às áreas de *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea*; estas duas últimas não diferem entre si (Anova *One-way* $p=0,016$, Bonferroni, $p=0,015$). A Figura 1D mostra que não houve diferença estatística em relação ao parâmetro Shape-Z ($p = 0,687$).

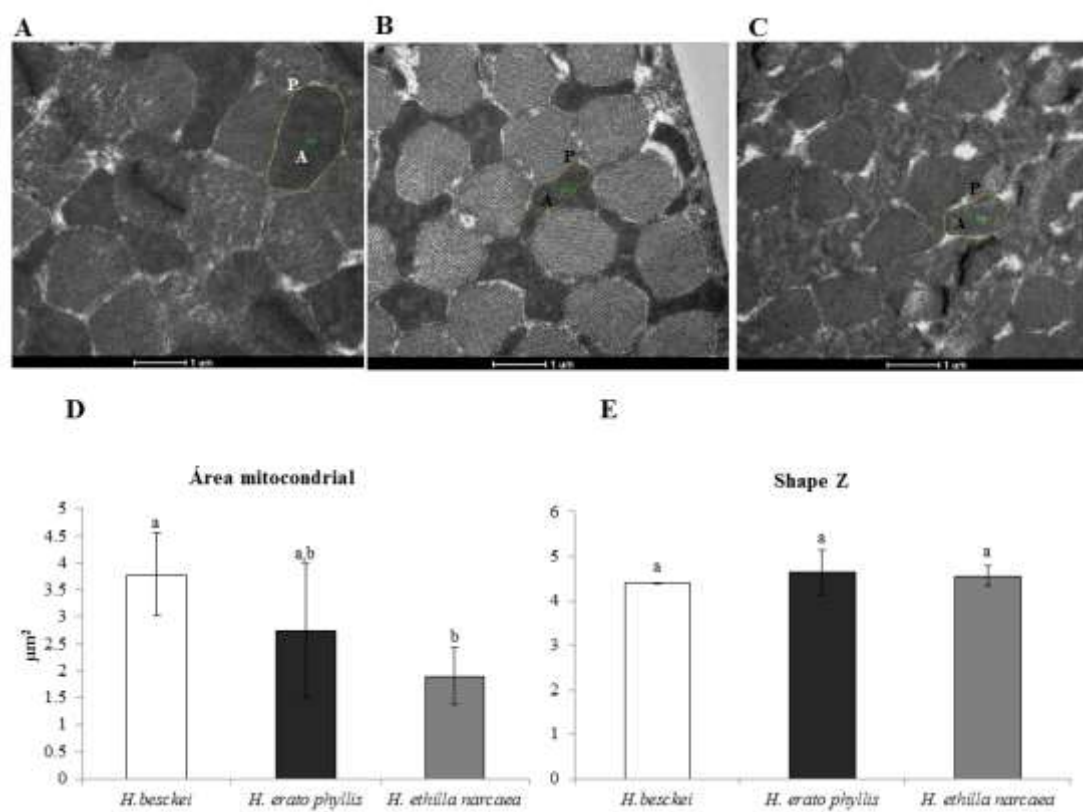


Figura 1. Análise ultraestrutural de células dos músculos torácicos (área mitocondrial e Shape Z) das espécies *H. besckei* (A), *H. erato phyllis* (B) e *H. ethilla narcaea* (C). Legendas: A: área, P: perímetro. Barra de calibração = 1 μm . Os dados em D, E, estão representados como a média \pm desvio padrão. Barras com letras iguais não diferem estatisticamente.

As densidades de mitocôndrias e de miofibrilas são mostradas na Figura 2D, E. Como se pode ver, não há diferenças significativas entre as espécies ($p=0,322$; $p=0,090$, respectivamente). É interessante notar que no caso da densidade de mitocôndrias, há uma relação inversa em relação ao mostrado na Figura 1D, com *H. besckei* com a menor densidade.

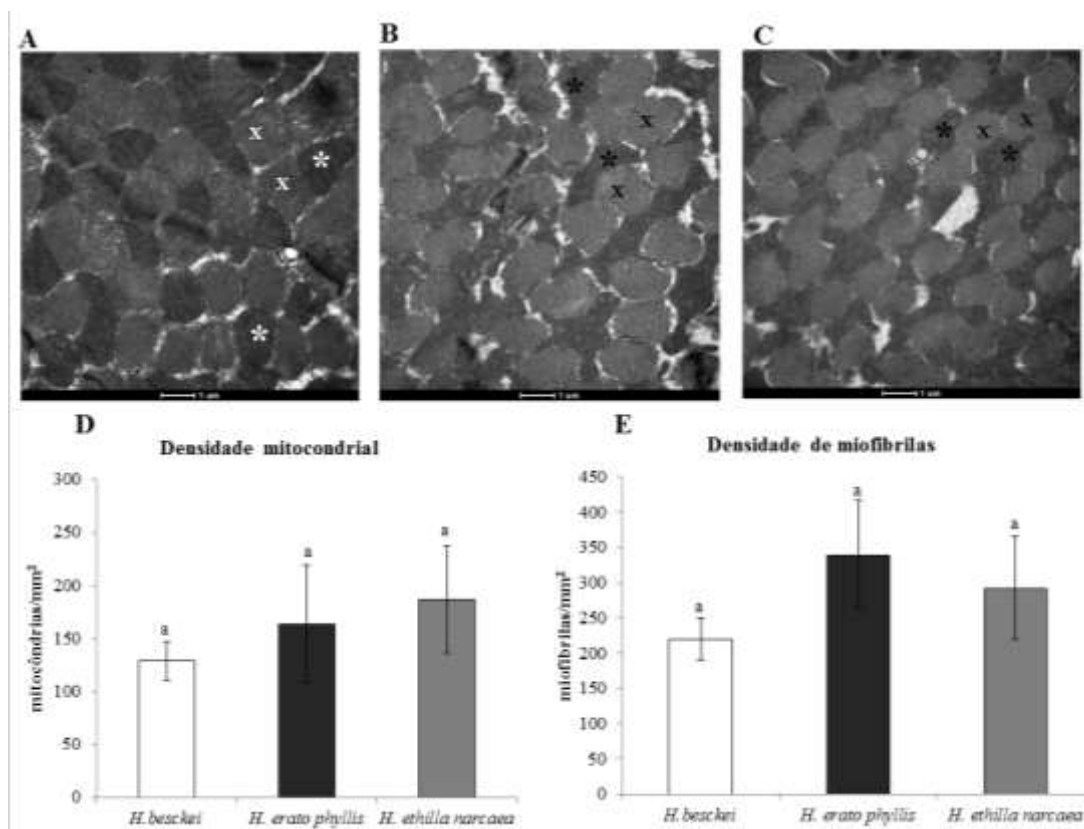


Figura 2. Análise ultraestrutural de células dos músculos torácicos de borboletas *Heliconius* (densidade de mitocôndrias e miofibrilas). Imagens digitalizadas das células musculares de *H. besckei* (A), *H. erato phyllis* (B) e *H. ethilla narcaea* (C) mostrando as mitocôndrias (*) e miofibrilas (x) (barra de calibração = 1 μm). Os dados estão representados como \bar{x} média \pm desvio padrão. Barras com letras iguais não diferem estatisticamente.

As porcentagens de tecido coberto por mitocôndrias e por miofibrilas são mostradas na Figura 3D, E. Como se pode ver, não há diferenças significativas entre as espécies ($p=0,182$; $p=0,224$, respectivamente).

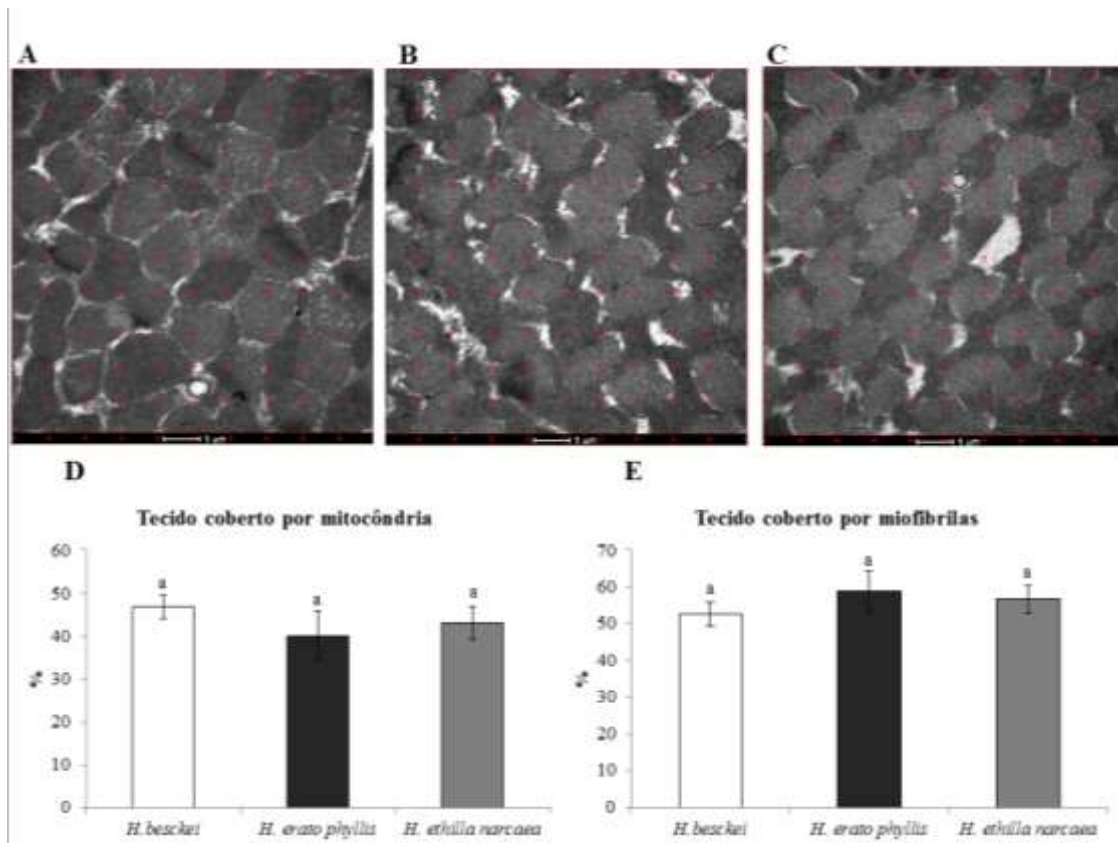


Figura 3. Análise ultraestrutural de células dos músculos torácicos (porcentagem de tecido coberto por mitocôndrias e por miofibrilas). Imagens das células musculares de *H. besckei* (A), *H. erato phyllis* (B) e *H. ethilla narcaea* (C). Os resultados estão expressos em porcentagem de tecido coberto por mitocôndrias e por miofibrilas. Os dados são representados com a média \pm dp.

A escala de tons de cinza para as mitocôndrias é mostrada na figura 4. A média dos valores da escala (0-255) para todas as espécies está entre 80 e 100, o que não configura diferença estatística ($p=0,066$) como podemos observar no gráfico D da mesma figura.

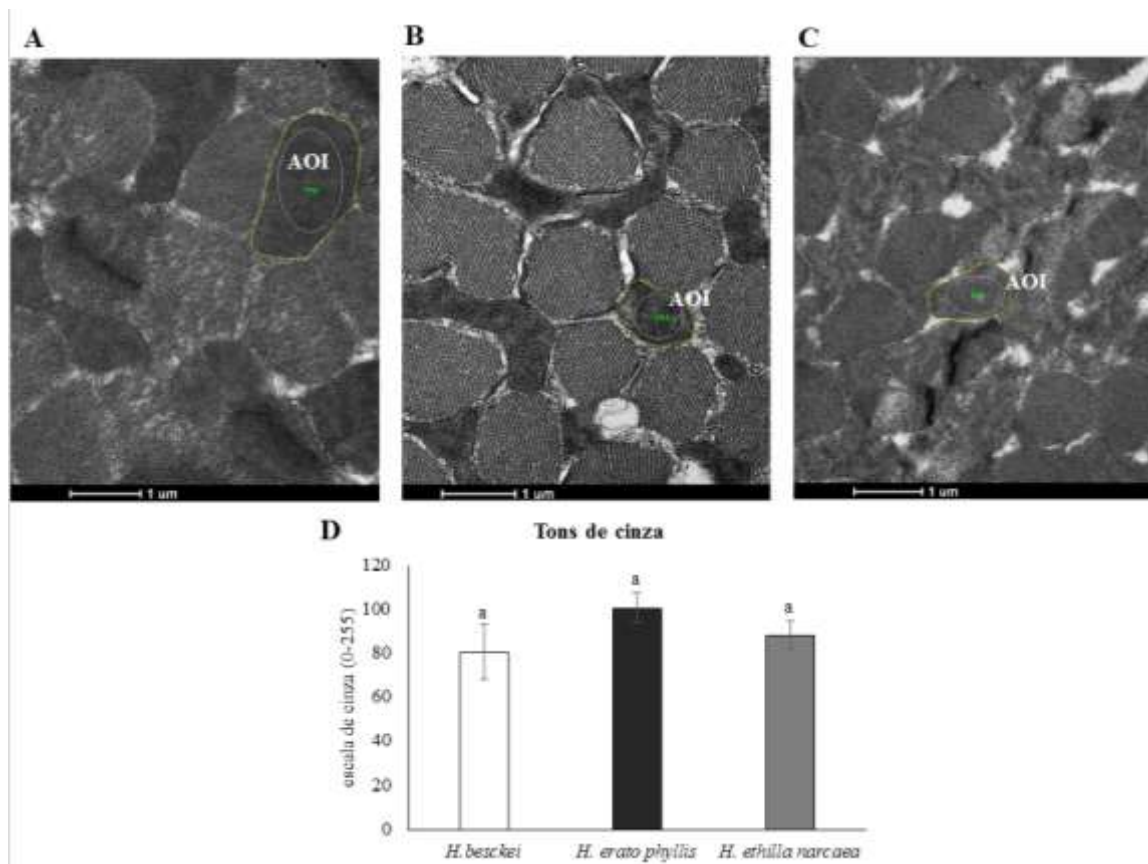


Figura 4. Análise ultraestrutural de células dos músculos torácicos (escala de tons de cinza) das espécies *H. besckei* (A), *H. erato phyllis* (B) e *H. ethilla narcaea* (C). AOI = área de interesse. Barra de calibração = 1 μ m. Os resultados são expressos como escala de cinza (0-255)(D).

1.3.2 Balanço oxidativo

A comparação geral entre as três espécies, para tórax e abdômen, mostrou diferenças significativas entre elas ($\text{MANOVA}_{\text{Tórax}} \lambda \text{Wilks}=0,112$ $p=0,020$) (Tabela 1). A análise de cada marcador está representada na Figura 5. A enzima catalase (CAT) foi o único marcador de balanço oxidativo que diferiu entre os tórax sendo que *H. erato phyllis* apresenta níveis maiores do que em *H. besckei* (Bonferroni $p=0,034$). TBARS, SOD E GST não apresentaram diferenças quando quantificadas no tórax. Em relação ao abdômen ($\text{MANOVA}_{\text{Abdômen}} \lambda \text{Wilks}=0,082$ $p=0,010$) houve diferenças nos níveis das enzimas. *H. ethilla narcaea* apresentou maior nível de SOD do que *H. besckei*

(Bonferroni $p=0,033$). Isto ocorreu também entre as mesmas espécies em relação à CAT (Bonferroni $p=0,026$). A enzima GST apresentou maior atividade também em abdômens de *H. ethilla narcaea* em relação com *H. erato phyllis* (Bonferroni $p=0,013$).

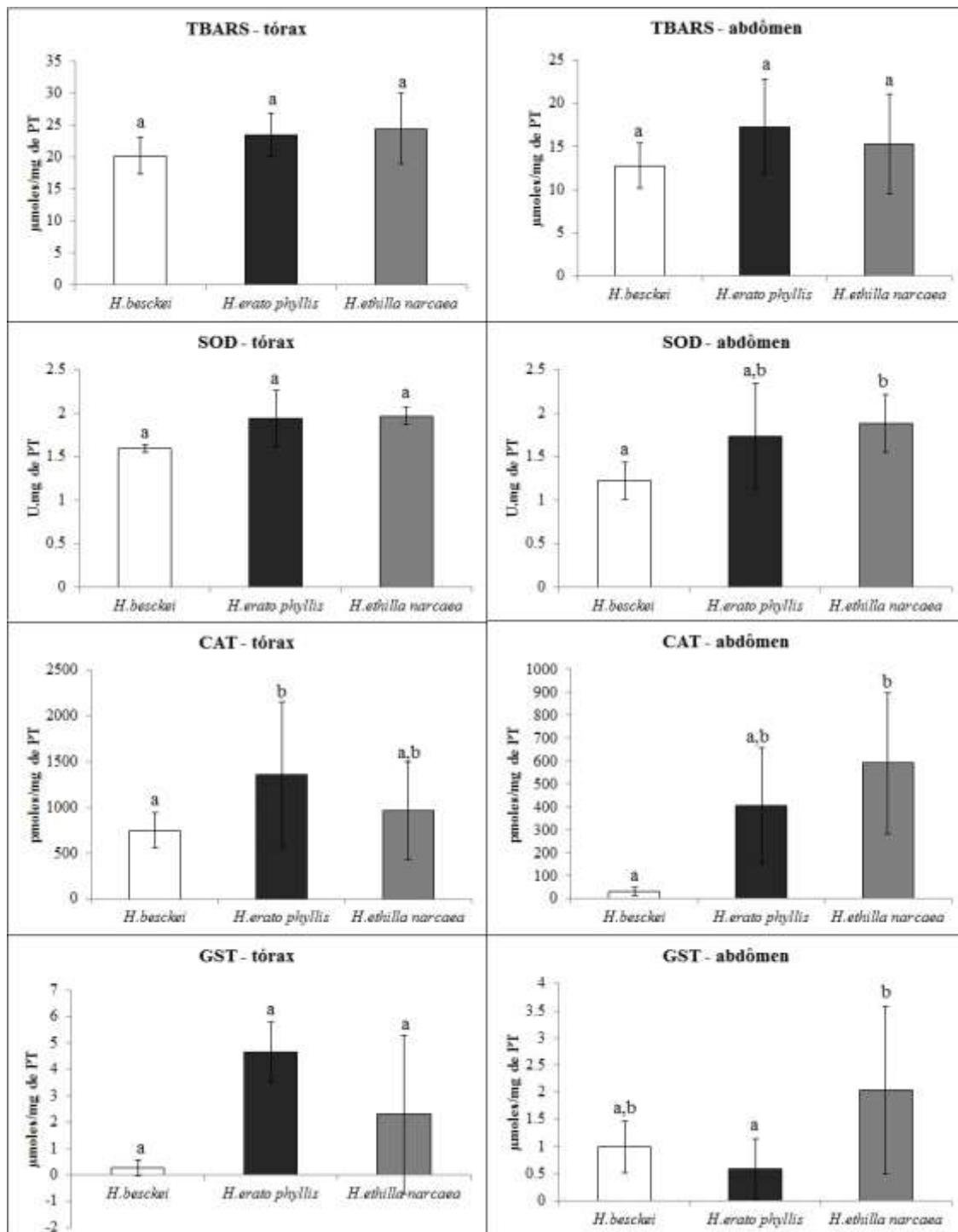


Figura 5. Níveis de peroxidação lipídica (TBARS), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST) de tórax (esquerda) e abdômen (direita) de *Heliconius besckei* (barra branca), *Heliconius erato phyllis* (cinza escuro) e *Heliconius ethilla narcaea* (cinza claro). Barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os valores médios para um $p < 0,05$.

1.3.3 Metabolismo intermediário

Na Figura 6, estão os resultados para peso de tórax e abdômen. *H. besckei* e sua co-mímica *H. erato phyllis*, tem pesos menores e que não diferem estatisticamente, tanto para tórax quanto para abdômen. Nota-se que *H. ethilla narcaea* apresenta os maiores valores para peso de tórax e abdômen (Anova One-way, Bonferroni $p=0,002$ e $p=0,008$, respectivamente)

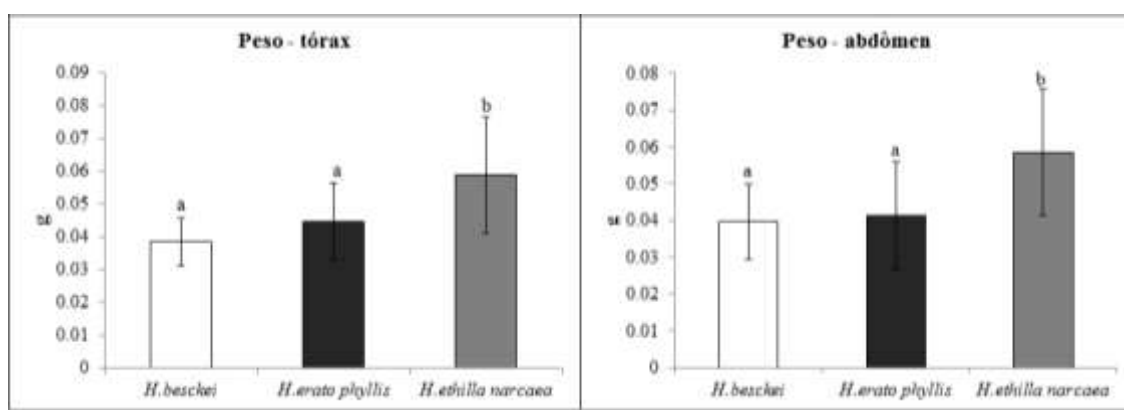


Figura 6. Massa de tórax e abdômen de borboletas *Heliconius*, *Heliconius besckei* (barra branca), *Heliconius erato phyllis* (barra cinza escuro) e *Heliconius ethilla narcaea* (barra cinza claro). Barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os valores médios para um $p < 0,05$.

Para os marcadores de balanço energético no tórax (Figura 7), não houve diferenças significantes na comparação geral entre as espécies (MANOVA_{Tórax} λ Wilks=0,367 $p= 0,238$). Todavia, há algumas diferenças numéricas que merecem alguma consideração; por exemplo, os maiores níveis de proteínas totais em tórax e abdomens de *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea* em relação à *H. besckei*. Os maiores níveis de ácido úrico no tórax e abdômen de *H. erato phyllis* também podem demonstrar especificidades dessa espécie. Esse biomarcador também apresentou nível mais baixo em *H. besckei* do que em relação às outras espécies. O mesmo ocorre para o metabólito lactato, nas mesmas proporções e relações entre as espécies.

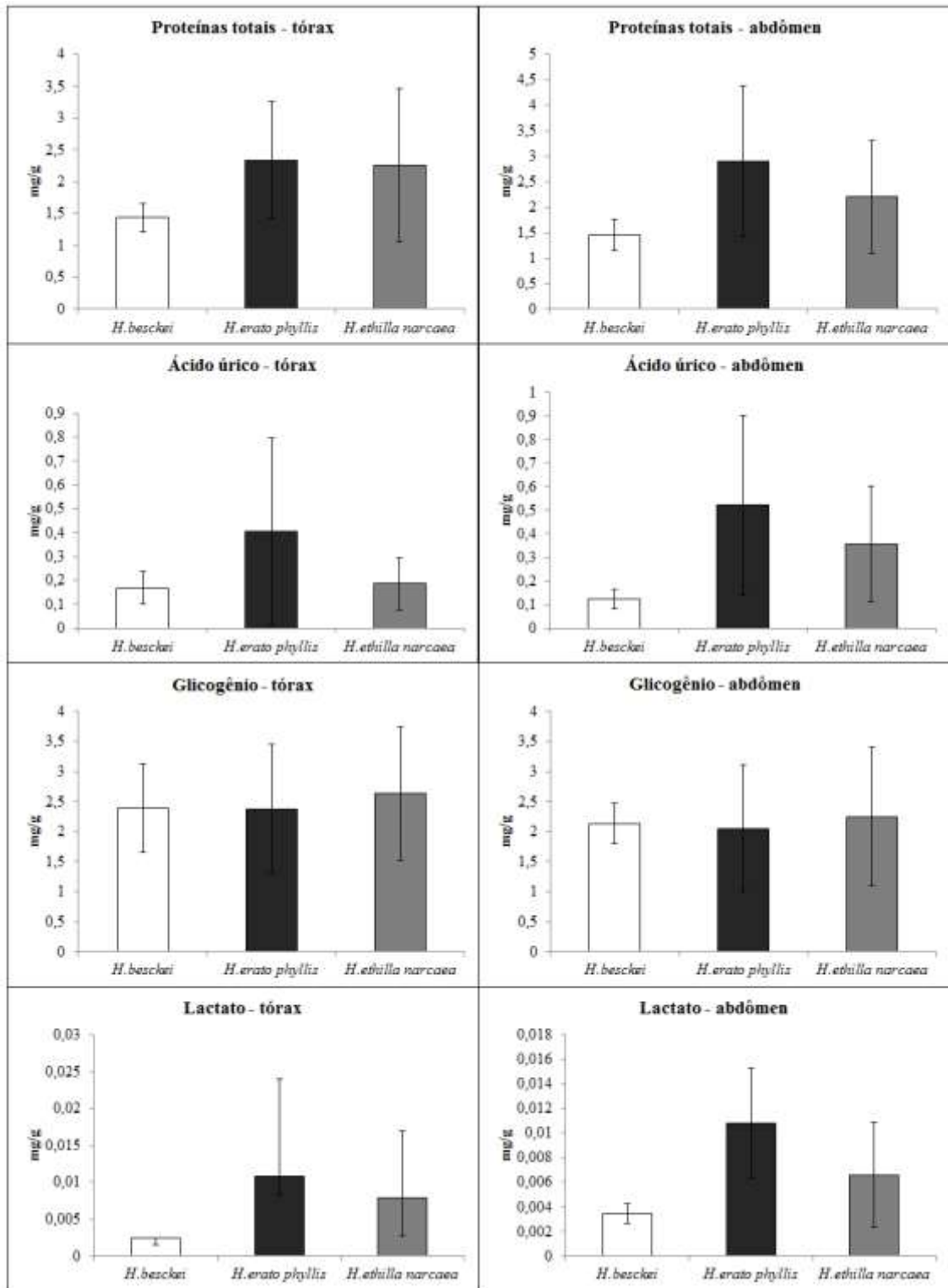


Figura 7. Níveis de proteínas totais, ácido úrico, glicogênio, lactato em tórax (esquerda) e abdômen (direita) nas três espécies. *Heliconius besckei* (barra branca), *Heliconius erato phyllis* (cinza escuro) e *Heliconius ethilla narcaea* (cinza claro). As barras representam as médias \pm desvio padrão.

Na figura 8 estão representados os valores médios dos níveis de lipídios totais, triglicerídeos e colesterol não apresentaram diferença significativa quando quantificamos em tórax (MANOVA, $\lambda Wilks_{torax}=0,391$ $p= 0,21$). No entanto para os abdômens, o nível de lipídios totais presentes em *H. erato phyllis* é maior do que nas espécies do clado silvaniforme, diferindo principalmente de *H. ethilla narcaea*.

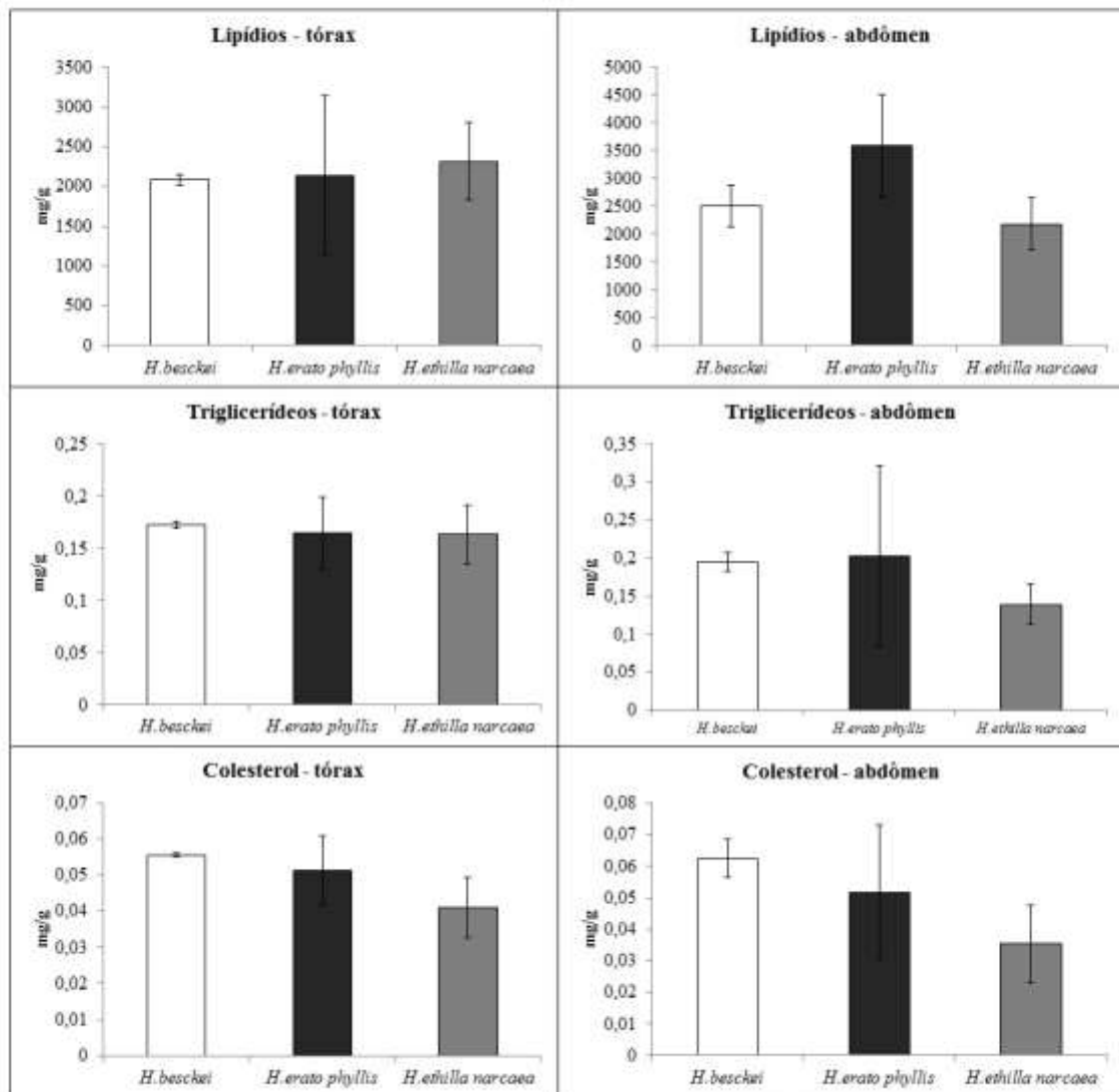


Figura 8. Níveis de lipídios totais, triglicerídios e colesterol em tórax e abdomens de borboletas *Heliconius*, *Heliconius besckei* (barra branca), *Heliconius erato phyllis* (cinza escuro) e *Heliconius ethilla narcaea* (cinza claro). Barras representam as médias \pm desvio padrão.

1.4 DISCUSSÃO

O estudo da fisiologia de borboletas do gênero *Heliconius* é muito pouco explorado, sendo este o primeiro trabalho que investiga os parâmetros de balanço oxidativo, metabolismo energético e ultraestrutura muscular destas borboletas. Além disso, a abordagem utilizada nos permite contribuir para o conhecimento de outras características, além do padrão de coloração das asas, que podem convergir para reforçar o mimetismo. Nossa hipótese é de que as espécies co-mímicas, *H. besckei* e *H. erato phyllis*, apesar de distantes filogeneticamente tenham convergido também em parâmetros fisiológicos, fazendo assim com que *H. besckei* apresente características fisiológicas distintas de sua aparentada filogenética *H. ethilla narcaea*.

Os parâmetros que investigamos abordam características que influenciam no voo das borboletas. Já foi relatado que espécies pertencentes ao mesmo anel mimético, apresentam características que evoluíram em conjunto para reforçar o padrão convergente de coloração (Jones et al., 2013). Em relação ao voo, as características que enfatizam essa afirmação estão relacionadas à funcionalidade, como a forma e tamanho da asa, comportamento e capacidade de voo (Dudley & Srygley, 1994; Rossato et al., 2018; Srygley, 1994). Quando analisadas as três espécies deste trabalho em relação à forma e tamanho da asa, ficou evidente que as características são similares entre as espécies miméticas distantes na filogenia (*H. besckei* e *H. erato phyllis*) e divergentes entre as espécies do mesmo clado (*H. besckei* e *H. ethilla narcaea* - Capítulo 2 desta Tese).

Os bioindicadores que analisamos neste trabalho apresentam diferenças nos seus níveis e atividade em relação às espécies. Não verificamos um padrão que agrupe as espécies, seja em relação ao mesmo clado, seja em relação ao anel mimético. No

entanto alguns parâmetros se destacam pela sua importância para a funcionalidade do voo.

A alta taxa metabólica dos músculos do voo pode gerar espécies reativas de oxigênio em excesso e conseqüentemente, dano oxidativo. Aqui nós medimos o dano oxidativo através da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, e não obtivemos diferenças significativas entre as espécies. Este resultado pode estar relacionado ao hábito alimentar destas borboletas que além de néctar se alimentam de pólen. A alimentação por pólen faz com que o indivíduo fique por longos períodos com grãos de pólen na probóscide, retirando os nutrientes necessários para suas atividades (Gilbert, 1972; Hikl & Krenn, 2011). Sabe-se que a composição do néctar é predominantemente composta por açúcares, grande quantidade de proteínas e lipídios, vitaminas, minerais, elementos traços e fibras, além de quantidades significativas de polifenóis, principalmente flavonóides que podem funcionar como antioxidantes (Hassan, 2011; Hikl & Krenn, 2011).

As borboletas podem ser capazes de gerar potencial antioxidante através do desvio da glicose do néctar e do pólen para o ciclo das pentoses-fosfatos (PPP), assim como já registrado em mariposas (Levin et al., 2017), reduzindo o dano oxidativo aos músculos do voo. Os insetos em geral oxidam vários combustíveis para o voo, como por exemplo, glicose, glicogênio, trealose, prolina, fosfoarginina e lipídios (Dudley, 2000). Dessa forma, as borboletas *Heliconius* com seu hábito de alimentação através do pólen, conseguem durante o voo adquirir nutrientes que devem ser usados para suas atividades. Os níveis de glicogênio entre as três espécies também não apresentou diferenças, o que fortalece nossa hipótese de que parte dos nutrientes adquiridos pelo pólen possa ser direcionada não só para o metabolismo dos músculos do vôo, mas também para seu balanço oxidativo.

Os danos oxidativos que podem ser causados pelo exercício intenso do voo das borboletas podem ocorrer nos miócitos em contração (Metcalf & Alonso-Alvarez, 2010; Powers & Jackson, 2008). Em função disto, analisamos também a ultraestrutura muscular das três espécies (*H. besckei*, *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea*). Nossas análises de escala de cinza, *shape Z* mitocondrial, densidade de mitocôndrias e de miofibrilas não apresentaram diferenças corroborando o obtido com a ausência de dano verificada pelos níveis de lipoperoxidação (TBARS) e com a possível causa já descrita relacionada à alimentação.

Além disso, com exceção da CAT, as enzimas antioxidantes não apresentaram diferenças no tórax, o que corrobora os resultados dos níveis de TBARS e da ausência de alterações nas mitocôndrias e miofibrilas dos músculos do voo. A CAT, no entanto, apresentou níveis mais baixos em *H. besckei* em relação às outras duas espécies. *H. besckei* apresentou também diferença significativa na área mitocondrial em relação à sua companheira de clado, *H. ethilla narcaea*, sendo a área maior em *H. besckei*. A relação entre o nível de catalase de *H. besckei* diferenciado das outras espécies no tórax deve estar relacionada com a maior área ocupada pelas mitocôndrias. Dessa forma, parece existir uma relação inversa entre o nível de atividade da catalase e a área mitocondrial nesta espécie.

Nossa hipótese se fortalece a partir dos conhecimentos de que a catalase é uma enzima de atividade peroxissomal e que são inúmeros os estudos relacionados à funcionalidade destas organelas, isto é, mitocôndrias e peroxissomos (Fransen et al., 2017; Geuze et al., 2003; Kim, 2017; Kim et al., 2006; Sugiura et al., 2017; Walton & Pizzitelli, 2012).

Para exercer suas atividades as organelas celulares se comunicam ativamente e interagem com outros compartimentos celulares. Assim como as mitocôndrias, os peroxissomos são organelas dinâmicas que adaptam seu número, morfologia e atividade dependendo do tecido e do estado nutricional deste. Os peroxissomos através da catalase exercem papel indispensável no metabolismo de espécies reativas de oxigênio. Novos peroxissomos são formados a partir do retículo endoplasmático ou por fusão de derivados de mitocôndrias. Alguns estudos documentam que os defeitos na biogênese do peroxissomo ou na função da mitocôndria coincidem com um aumento no volume do outro compartimento celular. O aumento do volume mitocondrial observado em vários tecidos (Fan et al., 2016; Rahim et al., 2016) ocasiona a inativação pelo menos parcial do peroxissoma devido ao *turnover* mitocondrial ineficiente (Fransen et al., 2017). Se o turnover não ocorre, ou seja, se a mitocôndria não se renova, ela não deixa escapar fragmentos que contribuem para a formação de peroxissomos, dessa forma as mitocôndrias vão se fundindo, tornando-se maiores e conseqüentemente, as células apresentarão menos peroxissomos. Sendo assim, a maior área mitocondrial de *H. besckei* corresponderia a menos fragmentos de mitocôndrias disponíveis para a formação de novos peroxissomos e assim a uma menor atividade da catalase neste ambiente celular e/ou organela. Contudo, estes animais não apresentaram um aumento da lipoperoxidação o que nos permite supor que outras macromoléculas, como por exemplo, as proteínas podem estar sofrendo dano oxidativo e/ou outros componentes do sistema antioxidante estão compensando esta perda.

Nos resultados obtidos para os metabólitos energéticos, *H. besckei* registrou baixos níveis de lactato no tórax e no abdômen. Lactato é produto da oxidação de glicogênio, principal combustível para os músculos do voo ou da trealose, principal açúcar circulante nos insetos. Essa espécie, assim como *H. erato phyllis* e *H. ethilla*

narcaea, apresenta um comportamento de voo extremamente dispendioso em relação ao gasto de energia, o voo *flapping*, além de possuir uma peculiaridade em relação às outras duas espécies que é o ambiente em que vive. *H. besckei* diferentemente das outras duas espécies estudadas, habita somente regiões de altitudes maiores que 700m, determinando uma mais baixa temperatura média, principalmente nos meses de inverno quando as espécies não são mais encontradas. Nessas condições espera-se que a necessidade e o gasto de energia sejam maiores. No entanto, não sabemos ao certo a história de vida de *H. besckei*, e o porquê desta restrição de habitat. Estes resultados podem ajudar a elucidar algumas características de vida dessa espécie.

Os marcadores de metabolismo energético nos mostraram que *H. erato phyllis* difere das espécies do clado silvaniforme, tanto em metabólitos quantificados no tórax quanto no abdômen. A massa de tórax e abdômen separa o par mimético, *H. erato phyllis* – *H. besckei* de *H. ethilla narcaea* e a área mitocondrial separa as espécies do mesmo clado (*H. besckei* e *H. ethilla narcaea*).

O tórax contém principalmente os músculos do voo (Srygley & Chai, 1990) e o abdômen, assim como outras características corporais também pode ser determinante para o desempenho do voo, por isso pesá-los e analisá-los produz bons indicadores do funcionamento (Norberg et al., 2002). Nossos resultados mostraram que *H. ethilla narcaea* apresenta peso maior de tórax e de abdômen do que as duas espécies miméticas, que não diferiram entre si. Isso mostra que de acordo com o peso corporal as espécies do par mimético são semelhantes. Nève & Hall (2016) aplicaram uma fórmula envolvendo o peso corporal e a superfície total da asa para estimar a energia necessária para o voo em borboletas. A partir desta fórmula obtiveram valores do que chamaram de “*wing loading*”, sendo que estes, segundo Heinrich (1986) e (Dudley, 1990) geralmente aumenta de acordo com a massa corporal das borboletas. A estimativa

de Nève & Hall (2016) se baseia-se em que maiores valores de de “wing loading” exigem batidas de asas mais rápidas e conseqüentemente maior temperatura do tórax (Bartholomew & Casey, 1978); ambas características que demandam grande quantidade de energia.

São poucos os estudos existentes sobre as espécies *H. besckei* e *H. ethilla narcaea*, tanto quanto a baixa frequência de estudos em relação ao voo de *Heliconius*. Dessa forma não temos valores de referências para comparações dos dados que obtivemos para os biomarcadores fisiológicos, tampouco dados concretos quanto à velocidade e altura do voo que estas espécies podem atingir. Essas informações seriam de extrema importância para confrontarmos nossos resultados.

No entanto, devido a ampla diversidade do gênero e destas espécies participarem de inúmeros anéis miméticos, incluso com espécies afastadas filogeneticamente, como itomíneos, podemos interpretar nossos resultados utilizando como base estudos envolvendo também estas espécies miméticas entre outras.

Existem evidências de que as alturas de voo das espécies de borboletas e mariposas e de seus mímicos ithomíneos são similares (Beccaloni, 1997). Este autor investigou se a altura do voo está relacionada com a oferta de planta hospedeira e mostrou que as espécies de *Mechanitis*, foram registradas voando a uma altura de 4,45 metros e que plantas hospedeiras ocorriam também à 6 metros. As espécies do gênero *Mechanitis* estudadas pelo autor, apresentam asas com o padrão de coloração “tigre”. Borboletas com esse padrão e pertencentes a este gênero ocorrem nas áreas estudadas neste trabalho e formam com *H. ethilla narcaea* anel mimético Mülleriano. Dessa forma espera-se que o padrão de voo de *H. ethilla narcaea* em relação à altura seja similar ao de seus miméticos itomíneos; isso, de fato, se confirma, tanto que em geral se utiliza

“armadilhas” para facilitar a captura, como um pano vermelho colocado sobre arbustos. Além disso, ressalta-se que o maior peso corporal e tamanho da asa (Conforme capítulo 2 da Tese) pode proporcionar maior “*wing loading*”.

Ainda sobre a altura do voo, Mallet & Gilbert (1995) analisaram algumas borboletas do gênero *Heliconius*, incluindo a espécie *H. erato* e registraram voo na borda de floresta na altura entre 1-3 metros. Eles perceberam que as plantas hospedeiras para a ovoposição e para alimentação, bem como os locais adequados para a cópula influenciam as regiões onde as borboletas voam e que isto pode ter relações com o mimetismo (Mallet & Gilbert, 1995). *Heliconius besckei* sendo mimética e simpátrica de *H. erato phyllis*, espera-se que também apresente voo à esta altura. O local de coleta, no interior do município de São Francisco de Paula em área de Floresta de Mata Atlântica, apresenta além de vegetação densa, algumas trilhas e pequenas áreas abertas, grande disponibilidade de flores para a alimentação das borboletas *Heliconius*. Estas flores estão presentes em diversas alturas do estrato florestal. A região também apresenta abundância de planta hospedeira para ambas as espécies, sendo difícil mencionar o tamanho e a quantidade devido à extensão da área. Nas observações de campo foi possível distinguir a maior altura e velocidade de voo para *H. ethilla narcaea*.

A partir de nossos resultados, observamos que a espécie *H. besckei* convergiu além de seu padrão de coloração e tipo de vôo, a massa corporal (tórax e abdômen), alguns marcadores do balanço oxidativo (TBARS, SOD e GST) e do metabolismo energético (proteínas totais, lipídios totais, triglicerídeos, colesterol e glicogênio), como também a área mitocondrial participando assim, do par mimético com *H. erato phyllis*. No entanto, as exigências fisiológicas para viver em simpatria com a espécie mimética parecem ser dispendiosas, isto exigiu a manutenção de diferenças quanto a alguns

marcadores tanto do balanço oxidativo (atividade da catalase) como do metabolismo energético (ácido úrico e lactato).

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Gianfranco Ceni pelo auxílio no trabalho de campo. A Técnica Moema Queiroz Oliveira pela preparação das amostras de MET no LabCEMM da PUCRS. À técnica Raquel do laboratório de Histologia. Ao PPG de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo suporte ofertado durante a realização do trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de doutorado no PPG de Ecologia e Evolução da Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa a BDC e a bolsa de produtividade a GTO 936 (n°307071/2015-4).

REFERÊNCIAS

- Altizer, S., Davis, A.K., 2009. Populations of monarch butterflies with different migratory behaviors show divergence in wing morphology. *Evolution* 64, 1018-1028.
- Bartholomew, G.A., Casey, T.M., 1978. Oxygen consumption of moths during rest, pre-flight warm-up, and flight in relation to body size and wing morphology. *Journal of Experimental Biology* 76, 11-25.
- Beccaloni, G.W., 1997. Vertical stratification of ithomiine butterfly (Nymphalidae: Ithomiinae) mimicry complexes: the relationship between adult flight height and larval host-plant height. *Biological Journal of the Linnean Society* 62, 313-341.

- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 34, 707-717.
- Boveris, A., Fraga, C.G., Varsaysky, A.I., Koch, O.R., 1983. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 227, 534-541.
- Boyland, E., Chasseaud, L.F., 1969. The role of glutathione and glutathione Stransferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 32, 173-219.
- De Senna, P.N., Bagatini, P.B., Galland, F., Bobermin, L., do Nascimento, P.S., Nardin, P., Tramontina, A.C., Gonçalves, C.A., Achaval, M., Xavier, L.L., 2017. Physical exercise reverses spatial memory deficit and induces hippocampal astrocyte plasticity in diabetic rats. *Brain Research* 1655, 242-251.
- Dudley, R., 1990. Biomechanics of flight in neotropical butterflies: morphometrics and kinematics. *Journal of Experimental Biology* 150, 37-53.
- Dudley, R., 2000. *The biomechanics of insect flight: form, function, evolution.* Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Dudley, R., Srygley, R.B., 1994. Flight physiology of neotropical butterflies: allometry of airspeeds during natural free. *Journal of Experimental Biology* 139, 125-139.
- Fan, J., Li, X., Issop, L., Culty, M., Papadopoulos, V., 2016. ACBD2/ECI2-mediated peroxisome-mitochondria interactions in Leydig cell steroid biosynthesis. *Molecular Endocrinology* 30, 763-782.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Fransen, M., Lismont, C., Walton, P., 2017. The peroxisome-mitochondria connection: how and why? *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1-24.
- Frings, C.S., Dunn, R.T., 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulphophospho-vanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology* 53, 89-91.
- García-Fiñana, M., Cruz-Orive, L.M., Mackay, C.E., Pakkenberg, B., Roberts, N., 2003. Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. *NeuroImage* 18, 505--516.

- Geuze, H.J., Murk, J.L., Stroobants, A.K., Griffith, J.M., Kleijmeer, M.J., Koster, A.J., Verkleij, A.J., Distel, B., Tabak, H.F., 2003. Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Molecular Biology of the Cell* 14, 2900-2907.
- Gibbs, M., Dyck, H.V., 2016. Butterfly flight activity affects reproductive performance and longevity relative to landscape structure. *Oecologia* 163, 341-350.
- Gilbert, L.E., 1972. Pollen feeding and reproductive biology of *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 1403-1407.
- Handel, E.V., 1965. Microseparation of glycogen, sugar, and lipids. *Analytical Biochemistry* 11, 266-271.
- Hassan, H.M.M., 2011. Chemical composition and nutritional value of palm pollen grains. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 6, 1-7.
- Heinrich, B., 1986. Comparative thermoregulation of four montane butterflies of different mass. *Physiological Zoology* 59, 616-626.
- Hikl, A.-L., Krenn, H.W., 2011. Pollen processing behavior of *Heliconius* butterflies : A derived grooming behavior. *Journal of Insect Science* 11, 1-13.
- Jones, R.T., Poul, Y.L., Whibley, A.C., Mrot, C., Ffrench-Constant, R.H., Joron, M., 2013. Wing shape variation associated with mimicry in butterflies. *Evolution* 67, 2323-2334.
- Kammer, A.E., 1967. Muscle activity during flight in some large Lepidoptera. *Journal of Experimental Biology* 47, 277-295.
- Kim, P., 2017. Peroxisome biogenesis: a union between two organelles. *Current Biology* 27, 259-281.
- Kim, P.K., Mullen, R.T., Schumann, U., Lippincott-Schwartz, J., 2006. The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *Journal of Cell Biology* 173, 521-532.
- Klowden, M., 2013. *Physiological systems in insects*, 3 ed. Academic Press, Cambridge.
- Levin, E., Lopez-Martinez, G., Fane, B., Davidowitz, G., 2017. Hawkmoths use nectar sugar to reduce oxidative damage from flight. *Science* 355, 733-735.
- Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 37, 293-303.

- Lima, K.G., Krausea, G.C., Silva, E.F.G., Xavier, L.L., Martins, L.A.M., Alice, L.M., Luz, L.B., Gassen, R.B., Filippi-Chiela, E.C., Haute, G.V., Garcia, M.C.R., Funchal, G.A., Pedrazza, L., Reghelin, C.K., Oliveira, J.R., 2018. Octyl gallate reduces ATP levels and Ki67 expression leading HepG2 cells to cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis. *Toxicology in Vitro* 48, 11-25.
- Mallet, J., Gilbert, L.E., 1995. Why are there so many mimicry rings? Correlations between habitat, behaviour and mimicry in *Heliconius* butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society* 55, 159-180.
- Martins, L.A.M., Vieira, M.Q., Ilha, M., Vasconcelos, M., Biehl, H.B., Lima, D.B., Schein, V., Barbé-Tuana, F., Borojevic, R., Guma, F.C.R., 2015. The interplay between apoptosis, mitophagy and mitochondrial biogenesis induced by resveratrol can determine activated hepatic stellate cells death or survival. *Cell Biochem Biophys* 71, 657-672.
- Mattila, A.L.K., 2015. Thermal biology of flight in a butterfly : genotype, flight metabolism, and environmental conditions. *Ecology and Evolution* 5, 5539-5551.
- Metcalf, N.B., Alonso-Alvarez, C., 2010. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology* 24, 984–996.
- Nève, G., Hall, C., 2016 Variation of thorax flight temperature among twenty Australian butterflies (Lepidoptera: Papilionidae, Nymphalidae, Pieridae, HesperIIDae, Lycaenidae). *European Journal of Entomology* 113, 571-578.
- Nation, J.L., 2008. *Insect Physiology and Biochemistry*, 2 ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Niven, J.E., Scharlemann, J.P.W., 2005. Do insect metabolic rates at rest and during flight scale with body mass? *Biology Letters* 1, 346-349.
- Norberg, U., Enfjäll, K., Leimar, O., 2002. Habitat exploration in butterflies – an outdoor cage experiment *Evolutionary Ecology* 16, 1-14.
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology* 301, 843-863.
- Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews* 88, 1243-1276.

- Rahim, R.S., Chen, M., Nourse, C.C., Meedeniya, A.C., Crane, D.I., 2016. Mitochondrial changes and oxidative stress in a mouse model of Zellweger syndrome neuropathogenesis. *Neuroscience* 334, 201-213.
- Rauhämäki, V., Wolfram, J., Jokitalo, E., Hanski, I., Dahlhoff, E.P., 2014. Differences in the aerobic capacity of flight muscles between butterfly populations and species with dissimilar flight abilities. *Plos One* 9, 1-8.
- Rossato, D.O., Boligon, D., Fornel, R., Kronforst, M.R., Gonalves, G.L., Moreira, G.R.P., 2018. Subtle variation in size and shape of the whole forewing and the red band among co-mimics revealed by geometric morphometric analysis in *Heliconius* butterflies. *Ecology and Evolution* 8, 3280-3295.
- Rucatti, A.L., Jaenisch, R.B., Rossato, D.D., Bonetto, J.H.P., Ferreira, J., Xavier, L.L., Sonza, A., Lago, P.D., 2015. Skeletal muscle electrical stimulation improves baroreflex sensitivity and heart rate variability in heart failure rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 193, 92-96.
- Srygley, R.B., 1994. Locomotor mimicry in butterflies? The associations of positions of centres of mass among groups of mimetic, unprofitable prey. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 343, 145-155.
- Srygley, R.B., Chai, P., 1990. Flight morphology of Neotropical butterflies: palatability and distribution of mass to the thorax and abdomen. *Oecologia* 84, 491-499.
- Srygley, R.B., Ellington, C.P., 1999. Discrimination of flying mimetic, passion-vine butterflies *Heliconius*. *Proceeding of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266, 2137-2140.
- Sugiura, A., Mattie, S., Prudent, J., McBride, H.M., 2017. Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature* 542, 251-254.
- Walton, P.A., Pizzitelli, M., 2012. Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. *Frontiers in Physiology* 3, 1-10.
- Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Cunha, C., Deonizio, J.M.A., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Research Protocols* 16, 58-64.
- Zera, A.J., Denno, R.F., 1997. Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annual Review of Entomology* 42, 207-230.

TABELA 1- Testes estatísticos, valores de significância e número amostral para as análises ultraestrutural, balanço oxidativo e energético de tórax e abdômen das espécies *Heliconius erato phyllis*, *H. besckei* e *H. ethilla narcaea*.

n	Análise ultraestrutural	Shapiro-Wilk	Levene	Teste	p	Bonferroni						
	área mitocondrial	0.067	0.351	Anova one-way	0.016	H.b - H.e p=0.091 H.b - H.e.n p=0.015 H.e. - H.e.n p = 0.526						
	% de área coberta por miofibrila	0.079	0.744	Anova one-way	0.224	H.b - H.e p=0.274 H.b - H.e.n p=0.829 H.e.p - H.e.n p= 1.000						
	% de área coberta por mitocôndria	0.163	0.559	Anova one-way	0.182	H.b - H.e p=0.220						
<i>H. besckei</i>	3					H.b - H.e.n p=0.964						
<i>H.e. phyllis</i>	6					H.e.p - H.e.n p= 1.000						
<i>H.e.narcaea</i>	4	Densidade de miofibrila	0.78	0.206	Anova one-way	0.09	H.b - H.e p=0.098 H.b - H.e.n p=0.586 H.e. - H.e.n p= 0.924					
		Densidade de mitocôndria	0.057	0.402	Anova one-way	0.322	H.b - H.e p=0.982 H.b - H.e.n p=1.000 H.e - H.e.n p= 0.426					
		Shape Z	0.116	0.159	Anova one-way	0.687	H.b - H.e p=1.000 H.b - H.e.n p=1.000 H.e - H.e.n p= 1.000					
		Escala de Tons de cinza	0.417	0.238	Anova one-way	0.066	H.b - H.e p=0.163 H.b - H.e.n p=1.000 H.e - H.e.n p= 0.142					
Balanço oxidativo	n	biomarcador - tórax	Shapiro-Wilk	Levene	Teste	p	Bonferroni					
<i>H. besckei</i>	3	TBARS	0.498	0.218	Manova	0.02	H.b - H.e p=1.000					
<i>H.e. phyllis</i>	5						H.b - H.e.n p=0.947					
<i>H.e.narcaea</i>	6						H.e - H.e.n p= 1.000					
		SOD	0.966	0.04			H.b - H.e p=0.309 H.b - H.e.n p=0.250 H.e - H.e.n p= 1.000					
							CAT	0.172	0.075			H.b - H.e p=0.034 H.b - H.e.n p=1.000 H.e - H.e.n p=0.111
												GST
Biomarcador -	Shapiro-Wilk	Levene	Teste	p	Bonferroni							

abdômen								
<i>H. besckei</i>	4	TBARS	0.012	0.177	Manova	0.01	H.b - H.e	$p=0.826$
<i>H.e. phyllis</i>	6				λ Wilks 0.082		H.b - H.e.n	$p=1.000$
<i>H.e.narcaea</i>	3						H.e - H.e.n	$p= 1.000$
		SOD	0.363	0.472			H.b - H.e	$p=0.523$
							H.b - H.e.n	$p=0.033$
							H.e - H.e.n	$p= 0.210$
		CAT	0.078	0.059			H.b - H.e	$p=0.082$
							H.b - H.e.n	$p=0.026$
							H.e. - H.e.n	$p= 0.827$
		GST	0.003	0.034			H.b - H.e	$p=1.000$
							H.b - H.e.n	$p=0.056$
							H.e. - H.e.n	$p= 0.013$
n	biomarcador - tórax	Shapiro-Wilk	Levene	Teste	p	Bonferroni		
<i>H. besckei</i>	4	Proteínas totais	0.17	0.062	Manova	0.238	H.b - H.e	$p=0.607$
<i>H.e. phyllis</i>	4				λ Wilks 0.367		H.b - H.e.n	$p=0.644$
<i>H.e.narcaea</i>	7						H.e - H.e.n	$p= 1.000$
		Ácido úrico	0	0.023			H.b - H.e	$p=1.000$
							H.b - H.e.n	$p=0.710$
							H.e - H.e.n	$p= 1.000$
		Glicogênio	0.796	0.82			H.b - H.e	$p=1.000$
							H.b - H.e.n	$p=1.000$
							H.e - H.e.n	$p=1.000$
		Lactato	0.126	0.008			H.b - H.e	$p=0.047$
							H.b - H.e.n	$p=0.134$
							H.e. - H.e.n	$p= 1.000$
	Biomarcador - abdômen	Shapiro-Wilk	Levene	Teste	p	Dunn		
<i>H. besckei</i>	4	Proteínas totais	0.449	0.069	Kruskal-Wallis	0.187	H.b - H.e	$p=0.102$
<i>H.e. phyllis</i>	6						H.b - H.e.n	$p=0.145$
<i>H.e.narcaea</i>	6						H.e - H.e.n	$p= 0.238$
		Ácido úrico	0.004	0.003	Kruskal-Wallis	0.041	H.b - H.e	$p=0.035$
							H.b - H.e.n	$p=0.329$
							H.e - H.e.n	$p= 0.908$
		Glicogênio	0.026	0.157	Kruskal-Wallis	0.57	H.b - H.e	$p=1.000$
							H.b - H.e.n	$p=1.000$
							H.e. - H.e.n	$p= 1.000$
		Lactato	0.022	0.061	Kruskal-Wallis	0.046	H.b - H.e	$p=0.782$
							H.b - H.e.n	$p=0.045$
							H.e. - H.e.n	$p= 0.357$

CAPÍTULO 2

Manuscrito redigido no formato *Original Article* do periódico *Biological Journal of the Linnean Society*

Morfometria geométrica em asas de borboletas *Heliconius*: a convergência da forma e tamanho associada ao mimetismo

Tiziane Fernandes Molina¹, Aldo Mellender Araújo^{2*}, André Luis Klein³, Guendalina Turcato Oliveira¹ e Luiz Ernesto Costa-Schmidt⁴

1. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Escola de Ciências. Programa de Pós graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade. Avenida Ipiranga, 6 6681, 90619-900. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Genética. Programa de Pós graduação em Genética e Biologia Molecular. Avenida Bento Gonçalves, 9500, 90650-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *autor correspondente: aldo1806@gmail.

3. Universidade Regional de Blumenau. Departamento de Ciências Naturais. Antônio da Veiga, 140, 89030-903. Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

4. Universidade do Vale do Rio dos Sinos. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação de Biologia. Avenida Unisinos, 950, 93022000. São Leopoldo, Rio Grande do Sul.

Título resumido: Morfometria geométrica em asas de *Heliconius* do sul do Brasil

RESUMO

As borboletas *Heliconius* formam o exemplo mais célebre de mimetismo Müllleriano. Nosso estudo investigou se o mimetismo de coloração de asas existente entre as espécies do sul do Brasil, *H. erato phyllis* (clado *pupal mating*) e *H. besckei*, se estende também à forma e tamanho das asas considerando que *H. besckei* pertença ao clado silvaniforme, da *H. ethilla narcaea*. Os resultados mostraram que as espécies miméticas apresentam maior semelhança no tamanho e na forma quando comparadas com *H. e. narcaea*. As duas características, tamanho e forma, da asa são importantes para a funcionalidade do voo e devem ter sido reforçadas pela pressão seletiva para fortalecer o padrão convergente de coloração.

Palavras-chave: anéis miméticos, formato da asa, *Heliconius besckei*, *H. ethilla narcaea*, *H. erato phyllis*

2.1 INTRODUÇÃO

Borboletas que pertencem ao gênero *Heliconius* são organismos modelo para o estudo da biologia evolutiva devido à sua variação intra e interespecífica em padrões miméticos de cores de asas que anunciam sua impalatabilidade a predadores visuais (Sheppard *et al.*, 1985; revisão de Merrill *et al.*, 2015). As borboletas *Heliconius* também contribuem nos estudos de especiação e das alterações genéticas envolvidas nos padrões filogenéticos (Baxter *et al.*, 2008; Jiggins *et al.*, 2001; Joron *et al.*, 2006a; Joron *et al.*, 2006b; Rosser *et al.*, 2018), bem como a evolução e evo-devo de mimetismo (Jiggins, 2017).

O mimetismo Mulleriano entre quaisquer duas espécies surge quando os benefícios mútuos resultam na seleção em direção a um fenótipo compartilhado, o que também pode envolver o comportamento (Jones *et al.*, 2013). Um exemplo da consequência dessa seleção pode ser a convergência no comportamento locomotor, juntamente com o padrão de cores comum, como mostrado por Srygley & Ellington (1999), que estudaram o movimento das asas em *Heliconius cydno* and *H. sapho*. Ambas as espécies batem as asas lentamente e com movimentos simétricos em relação às espécies irmãs *H. melpomene* and *H. erato*. Este exemplo reforça o fato de que o movimento das asas, bem como a forma da asa, é um componente importante para todo o sinal mimético, além da capacidade de manobras de voo e hábitos migratórios (DeVries *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2011). Apesar da importância da forma da asa para a aparência e para a locomoção de borboletas miméticas, poucos estudos tem realizado testes sobre as diferenças de formas de asa entre pares de comiméticos (Jones *et al.*, 2013) e mais escassos ainda são os trabalhos que analisam as borboletas no sul do Brasil (Klein & Araújo, 2013; Rossato *et al.*, 2018).

Um dos padrões de cores de asas mais difundidos entre *Heliconius* é o fenótipo composto por uma grande macha vermelha, nas asas anteriores e uma barra amarela nas asas posteriores, ambas em fundo preto (Klein & Araújo, 2013). Este fenótipo foi assim descrito no Brasil por Sheppard *et al.* (1985), tanto para *Heliconius melpomene nanna* como para *H. erato phyllis*. A única espécie do clado silvaniforme que apresenta esse fenótipo é *H. besckei* (Wallbank *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). No Brasil, *H. besckei* é simpátrica com *Heliconius ethilla narcaea*, também do clado silvaniforme, e com *H. erato phyllis* do clado *pupal mating*. Apesar de *H. besckei* ser restrita geralmente a regiões acima de 700m no sul, sudeste e nordeste do Brasil (Cardoso, 2005), *H. erato* e *H. ethilla*, ocorrem em diferentes altitudes. As superfícies dorsal e ventral dos indivíduos de *H. erato phyllis* e *H. besckei* diferem basicamente na tonalidade e por uma linha vermelha marginal na superfície ventral da asa posterior de *H. besckei* (Klein & Araújo, 2013). O presente trabalho investiga a possibilidade de que a forma e o tamanho da asa de *H. besckei* (pertencente ao clado silvaniforme) tenham evoluído adaptativamente para ser similar à *H. erato phyllis* (pertencente ao clado *pupal mating*).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Borboletas

Foram amostrados espécimes adultos de *H. besckei*, *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea*, durante o período de 2012 até 2017, em seis localidades no sul do Brasil (Rio Grande do Sul - RS: Porto Alegre, Viamão, Eldorado do Sul, São Francisco de Paula; Santa Catarina - SC: Campo Alegre; Paraná - PR: Paulo Freitas). De cada espécime analisamos suas asas anteriores e posteriores separadamente, incluindo apenas em nosso conjunto de dados aqueles em perfeitas condições (Tabela 1).

Tabela 1. Número de asas utilizadas no estudo, por localidade e espécie.

Espécies	Localidade	Asas	
		anteriores	posteriores
<i>Heliconius besckei</i>	São Francisco de Paula – RS	4	10
	Campo Alegre – SC	13	10
	Paula Freitas - PR	52	47
<i>Heliconius erato phyllis</i>	São Francisco de Paula - RS	23	24
	Porto Alegre - RS	19	21
	Viamão - RS	14	13
	Eldorado do Sul - RS	12	12
	Paula Freitas - PR	9	3
	Campo Alegre - SC	–	2
<i>Heliconius ethilla narcaea</i>	São Francisco de Paula - RS	2	6
	Porto Alegre - RS	24	16
	Paula Freitas - PR	8	7
Total		180	171

2.2.2 Morfometria geométrica

Selecionamos 21 marcos anatômicos bidimensionais para as asas anteriores e 16 para as asas posteriores, que seguiam o contorno da asa e a justaposição da venação conforme proposto por (Mérot *et al.*, 2013) (Fig. 1). Utilizamos apenas asas em condições ótimas que foram fotografadas na face ventral (câmera digital Nikon D90, 12,3 megapixels de resolução). Organizamos a sequência de imagens com o programa tpsUtil (Rohlf, 2015) e em seguida registramos os marcos anatômicos com o programa tpsDig2 (Rohlf, 2015). Todas as imagens continham uma escala milimétrica.

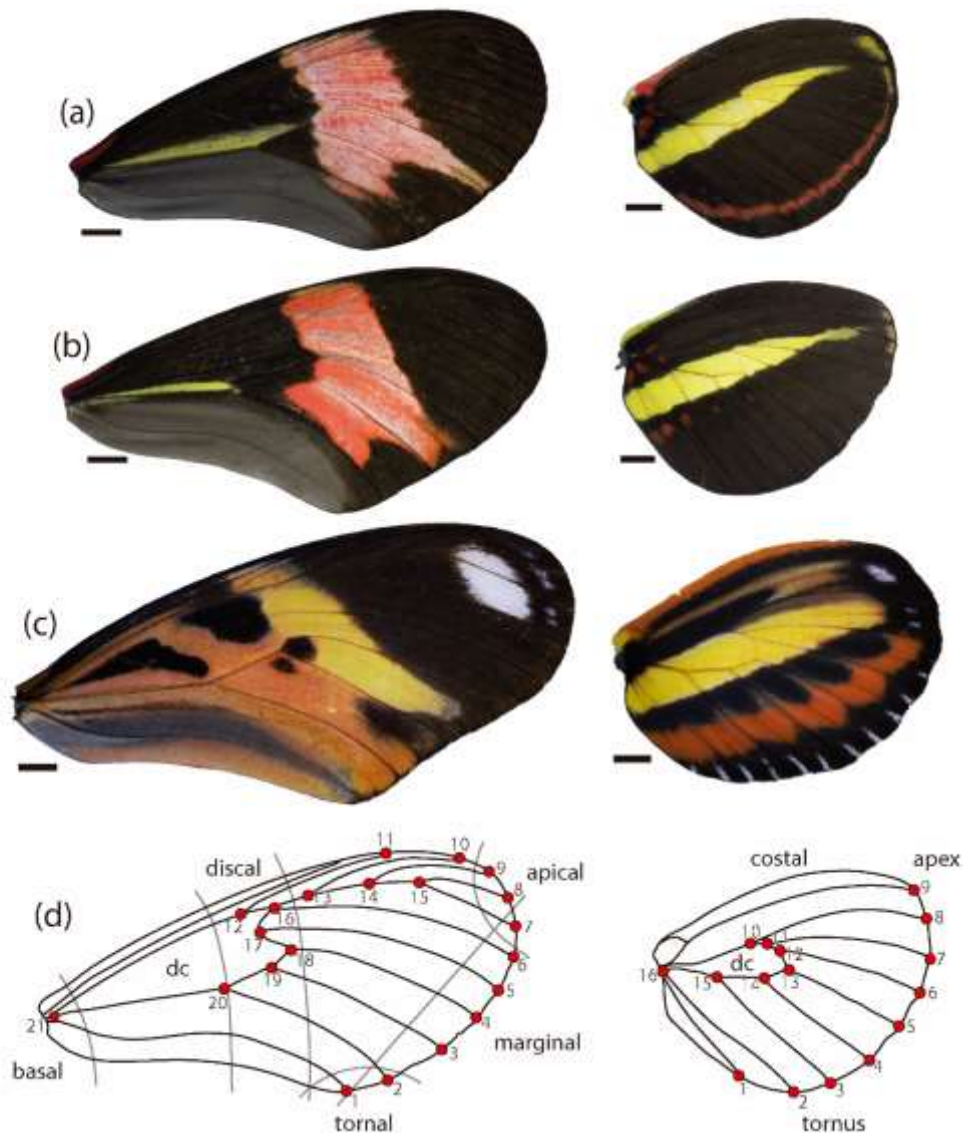


Fig. 1. Vista ventral das asas anteriores e posteriores das espécies analisadas a) *Heliconius besckei* b) *Heliconius erato phyllis* c) *Heliconius ethilla narcaea*. d) Disposição dos *landmarks* e regiões das asas anteriores e posteriores (dc = célula discal). Escala = 2mm.

Através da sobreposição generalizada de Procrustes obtivemos dois componentes morfométricos independentes: um componente de forma e um componente de tamanho. Esse procedimento foi realizado para asas anteriores e asas posteriores separadamente. O componente de forma consistiu em uma projeção

perpendicular das coordenadas da forma de cada asa em um espaço tangente ao espaço de forma de Procrustes. Ao contrário do espaço de forma, o espaço tangente segue as propriedades Euclidianas convencionais (Viscosi & Cardini, 2012), permitindo assim a aplicação de técnicas de análises estatísticas multivariadas.

Avaliamos graficamente as diferenças de forma através dos diagramas representando as grades de deformação provenientes dos escores dos componentes principais. Essa técnica permite identificar onde nas estruturas avaliadas ocorrem as maiores mudanças de forma em cada componente principal de maneira independentemente.

Descrevemos o tamanho das asas pelo tamanho do centróide da configuração de marcos anatômicos de cada asa. O tamanho do centróide corresponde a raiz quadrada do somatório do quadrado das distâncias de cada marco anatômico em relação ao centro de massa da configuração de pontos (centróide).

2.2.3 Análises estatísticas

Para o componente de tamanho, constatamos que a distribuição dos dados não atendia a premissa de normalidade para alguns dos níveis de classificação por espécie, limitando assim a aplicação de testes de hipótese paramétricos (Shapiro-Wilk normality test; Forewings: $W_{besckei} = 0.95$, $p = 0.01$; $W_{phyllis} = 0.98$, $p = 0.47$; $W_{ethilla} = 0.90$, $p < 0.01$; Hindwings: $W_{besckei} = 0.97$, $p = 0.11$; $W_{phyllis} = 0.98$, $p = 0.24$; $W_{ethilla} = 0.89$, $p = 0.012$). Assim, comparamos o tamanho entre os grupos através de um teste de Kruskal-Wallis, seguido de um *Wilcoxon rank sum test* para comparações par-a-par.

Para o componente de forma, primeiramente aplicamos uma análise de componentes principais (PCA) sobre as coordenadas do espaço tangente a fim de

reduzir a dimensionalidade da variação observada, bem como garantir a ortogonalidade de cada componente. Sobre os escores dos componentes da PCA, testamos o efeito da classificação das amostras por espécie através de uma análise de variância multivariada (MANOVA), assumindo que diferenças significativas representariam formas de asas diferentes em pelo menos uma das comparações interespecíficas. Neste caso, testes par-a-par foram executados, levando em conta o ajuste de significância de Bonferroni.

Em um segundo momento aplicamos uma *Linear Discriminant Analysis* (LDA) para determinar o grau de concordância da nossa classificação por espécies com a informação disponível na forma das asas. Por fim, realizamos uma CVA (*Canonical variates analysis*) para descrever as características da forma que melhor distinguem uma espécie da outra.

Todas as análises foram rodadas no ambiente R (R-Core-Team, 2017) utilizando as funções disponibilizadas pelo pacote *geomorph* versão 3.0.7 (Adams *et al.*, 2018).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Variação no tamanho das asas

O tamanho das asas anteriores e posteriores foram diferentes entre as três espécies (asas anteriores: Kruskal-Wallis $\chi^2 = 47.47$, $p < 0.0001$; asas posteriores: Kruskal-Wallis $\chi^2 = 20.53$, $p < 0.001$), tanto em relação às asas anteriores, quanto as posteriores. A espécie *H. e. narcaea* apresentou asas maiores do que *H. besckei* e de *H. e. phyllis*, tanto para asas anteriores como para asas posteriores (Fig. 2). Já o par de espécies *H. besckei* e *H. e. phyllis* não diferiu quanto ao tamanho de suas asas anteriores ou posteriores (Fig. 2).

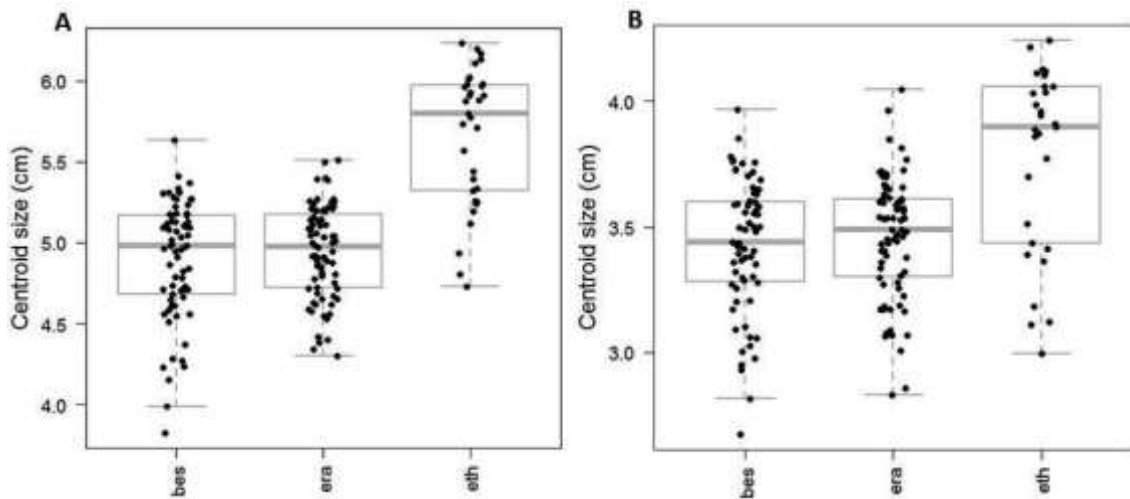


Fig. 2. Variação no tamanho do centróide das asas anteriores (A) e asas posteriores (B) para as três espécies (*Heliconius besckei*, *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea*). A linha horizontal mais escura representa a mediana, as margens das caixas representam os percentis e os círculos os indivíduos. bes = *H. besckei*; era = *H. erato phyllis*; eth = *H. ethilla narcaea*.

2.3.2 Variação na forma das asas

Constatamos a existência de diferenças na forma das asas anteriores e posteriores entre as três espécies. Para as asas anteriores (Fig. 3A), o primeiro componente da PCA explicou 31% da variação observada. Esse primeiro componente tendeu a separar as espécies do clado silvaniformes da espécie do clado *pupal mating*. Em termos morfológicos, a variação da forma das asas foi representada pelo alongamento das partes discal e apical da asa ao longo do primeiro componente principal. Já o segundo componente principal explicou 19% da variação observada, tendendo a separar as espécies pertencentes ao mesmo clado. Ao longo desse eixo percebe-se o estreitamento da região discal e apical das asas de *H. besckei* em relação a *H. e. narcaea* (Fig. 3A). O resultado da MANOVA corroborou a interpretação gráfica

da PCA, onde cada uma das espécies diferiu quantitativamente em relação a forma das asas anteriores das outras duas espécies (MANOVA global: Wilks = 0.0085, $F_{\text{approx}} = 36.23$, $df_{\text{num}} = 76$, $df_{\text{den}} = 280$, $p < 0.0001$; MANOVA par-a-par: todas comparações com $p < 0.0001$).

Para as asas posteriores observamos o mesmo padrão de diferença entre os grupos. O primeiro componente principal explicou 46.5% da variação da forma, sendo possível observar graficamente a separação das três espécies (Fig. 3B). Essa variação ao longo do primeiro componente é marcada pelo acentuado estreitamento na parte discal da asa. O segundo componente principal respondeu por 16.9% da variação global, deixando ainda mais nítida a diferença entre *H. besckei* e *H. e. narcaea*. Nesse eixo observa-se que o alongamento da parte discal da asa posterior de *H. e. narcaea* é mais acentuado do que nas asas anteriores, tornando assim as duas espécies mais separadas na representação gráfica (Fig. 3B). O resultado da MANOVA confirmou que cada uma das espécies possui uma forma de asa específica (MANOVA global: Wilks = 0.011, $F_{\text{approx}} = 42.29$, $df_{\text{num}} = 56$, $df_{\text{den}} = 282$, $p < 0.0001$; MANOVA para-a-par: todas comparações com $p < 0.0001$).

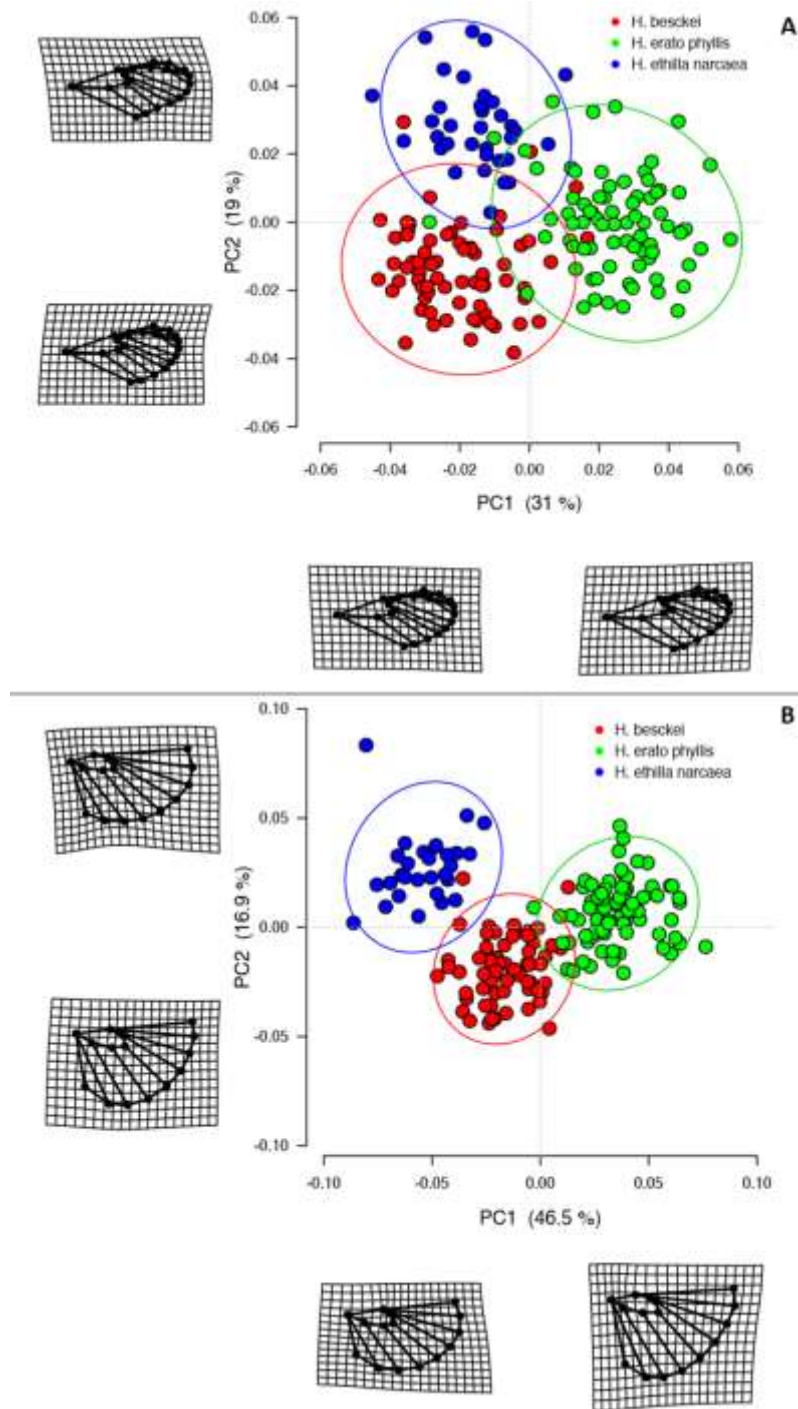


Fig. 3. Análise dos componentes principais 1 e 2 para as asas anteriores (A) e posteriores (B). Cada ponto representa um indivíduo (verdes = *H. erato phyllis*; vermelhos = *H. besckei*; azuis = *H. ethilla narcaea*) e os três círculos, as elipses de confiança 95%.

A análise gráfica da CVA recuperou o isolamento da forma das asas anteriores e asas posteriores já observados pela PCA, porém com maior grau de segregação entre as espécies (Fig. 4). A principal diferença constatada, no entanto, diz respeito às asas anteriores, onde ao longo do CV1 se observa a sobreposição das espécies *H. besckei* e *H. erato phyllis* e o isolamento da espécie *H. ethilla narceae* (Fig. 4A). A CVA para as asas posteriores apresentou o mesmo padrão observado pela PCA, sendo possível isolar cada uma das espécies a partir dos cores do primeiro componente canônico (CV1) (Fig. 4B).

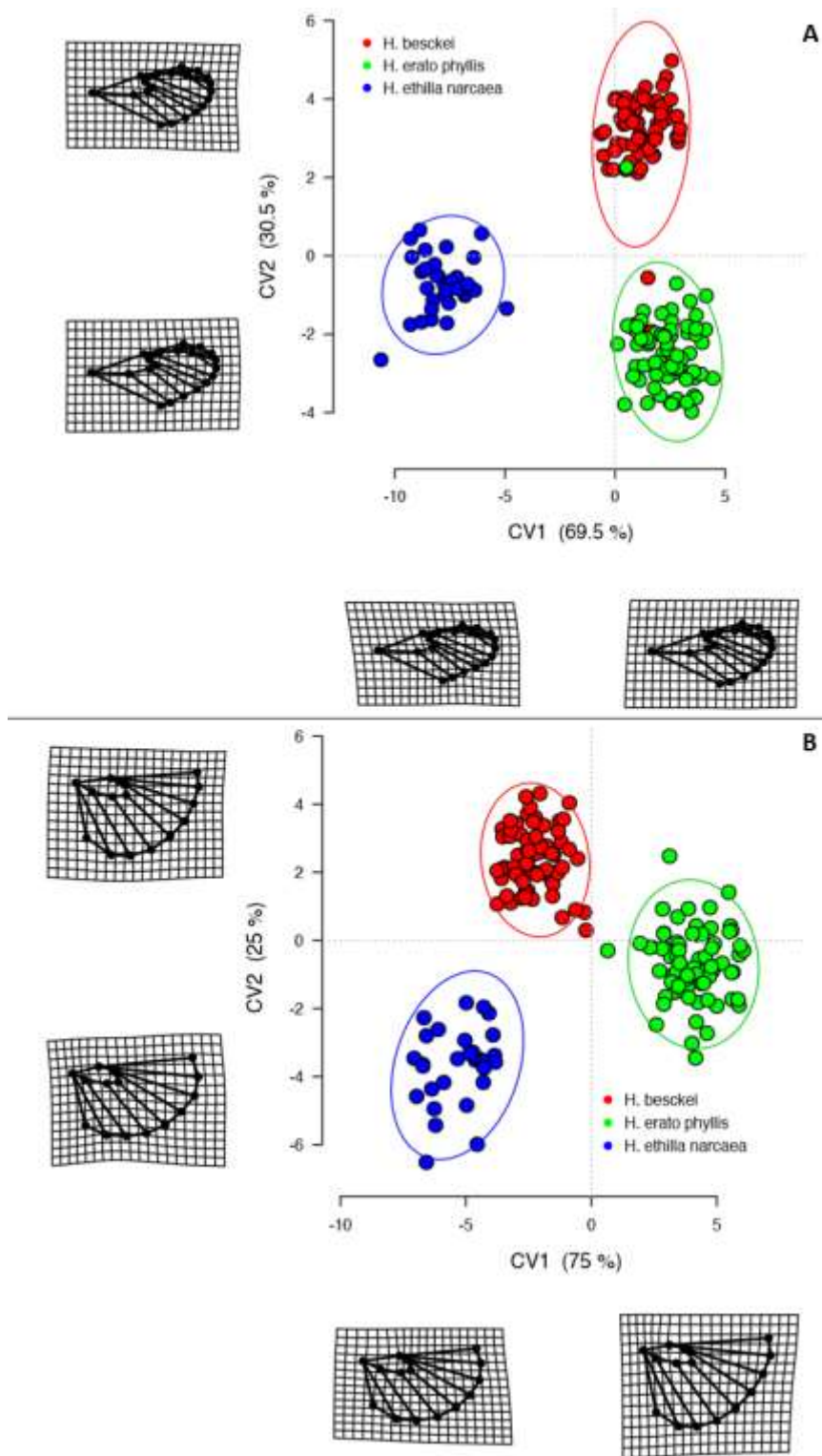


Fig. 4. Análise canônica quanto à forma das asas anteriores (A) e posteriores (B) nas três espécies. As cores utilizadas são as mesmas da Fig. 3, para cada espécie.

2.4 DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados corroboram nossa hipótese de que a pressão de seleção favorecendo o mimetismo entre *H. besckei* e *H. erato phyllis* vai além do padrão de coloração das asas dessas duas espécies. Principalmente para as asas anteriores, podemos dizer que características estruturais de suas asas – tamanho e forma – demonstraram uma maior correspondência entre o par de espécies miméticas do que quando comparado com *H. ethilla narcaea*, mesmo que esta última tenha afinidades ecológicas (simpatria) e históricas (clado dos silvaniformes) com *H. besckei*.

O resultado que obtivemos quanto ao tamanho do centróide das asas, reflete um padrão de agrupamento mimético que também já foi registrado para outros heliconíneos (Jones *et al.*, 2013). Estudos já evidenciaram que as asas com tamanhos menores são propensas a voos mais lentos, que geralmente habitam espaços restritos e de vegetação densa (Betts & Wootton, 1988). Além do tamanho similar e pequeno, a convergência nos padrões de forma nas asas anteriores pode estar associado à sinalização de advertência direcionada aos predadores. A mancha vermelha nas asas das *Heliconius* está nas asas anteriores, sendo exibida durante o voo lento, sinalizando aos predadores que estas espécies apresentam defesas químicas. Assim, o padrão convergente do tamanho e forma das asas dos comímicos seria uma maneira de reforçar o padrão de coloração já compartilhado, ainda mais que o voo lento é comum nos gêneros *Heliconius* e *Danaus* (Srygley, 1994; Srygley & Chai, 1990), permitindo assim uma maior exposição dos padrões de colorações de aviso sobre suas defesas.

Alguns estudos conseguiram mostrar que existe convergência na cinemática do voo entre membros do mesmo anel mimético, mesmo quando estes sejam distantemente aparentados (Jones *et al.*, 2013; (Srygley *et al.*, 1999). Neste caso presume-se que isto se deu através da seleção dos mímicos, no entanto, os mesmos trabalhos, não conseguem

distinguir entre a seleção que atua na cinemática do voo e a que age para forma da asa (Srygley *et al.*, 1999).

As diferenças significativas na forma das asas obtidas entre espécies do mesmo clado revela, assim como em (Jones *et al.*, 2013), a semelhança entre as espécies mais afastadas e com o mesmo padrão de coloração de aviso. Da mesma maneira que nos nossos resultados, Rossato *et al.* (2018) registrou proximidade entre *H. besckei* de *H. e. phyllis*. No entanto, a análise realizada no referido artigo envolveu outras espécies do mesmo anel mimético (*H. melpomene nanna* e *H. melpomene burchelli*), gerando uma ampla sobreposição entre as espécies que dificultou a visualização das diferenças descritas. Em nossa análise não houve qualquer sobreposição de grupos, apenas o distanciamento maior de *H. e. narcaea* das outras duas espécies.

O padrão de forma entre as espécies comímicas apresenta maior semelhança nas asas anteriores. Para *H. e. phyllis* e *H. besckei* são mais estreitas e a região basal das asas é mais alongada do que em *H. e. narcaea*. Em contrapartida, *H. e. narcaea* apresenta a parte discal, ou seja, o centro da asa e a parte apical mais alongadas que as miméticas. Esses resultados remetem aos dados de voo apresentados pelas espécies em que observamos o voo vibratório de *H. erato phyllis* e *H. besckei* e o voo plano de *H. e. narcaea*. Obviamente o voo das borboletas é composto por um grande conjunto de comportamentos, e a proporção de ocorrência deles é o que determina o gasto energético e a eficácia para a atividade. Sendo assim, a seleção opera na morfologia da asa dependendo também da aerodinâmica requisitada pelo comportamento do voo (Cespedes *et al.*, 2015). As borboletas que possuem o voo plano tem a forma da asa anterior alongada e maior valor de tamanho do centróide, teoricamente diminuindo os custos de energia (DeVries *et al.*, 2010; Dudley, 2000). Embora no presente trabalho não tenhamos avaliado os gastos energéticos, resultados se mostram compatíveis com

os que registramos em *H. e. narcaea*. Por outro lado, as borboletas que realizam o *flapping flight* tem asas anteriores de forma mais compacta. Essas borboletas, assim como *H. besckei* e *H. e. phyllis* tem menor tamanho de centróide da asa.

A região basal das asas posteriores nas espécies miméticas também é mais alongado, assim como nas anteriores, e a margem externa e célula discal são mais estreitas que em *H. e. narcaea*. Apesar destas características servirem de diferencial para a análise de variáveis canônicas (CVA) separar a forma das asas posteriores dos grupos miméticos de *H. ethilla narcaea*, *H. besckei* possui características mais acentuadas que também servem para distingui-la de *H. erato phyllis*. O segundo componente da variável canônica (CV2) mostra a diferenciação da disposição dos grupos quando comparamos com a CVA das asas anteriores. Essa disposição se dá por conta da porção discal e da margem externa das asas posteriores de *H. besckei*, que são mais alongadas que a de *H. erato phyllis*.

Outra informação importante que emerge dos nossos dados é que possivelmente as asas evoluíram separadamente e que, além disso, tem funções diferentes relacionadas ao voo. Jantzen & Eisner (2008) mostraram que as asas anteriores são mais relevantes para o voo das borboletas, já que quando perdem as asas anteriores não conseguem voar, enquanto que sem as asas posteriores a ocorrência do voo não é prejudicada. Sendo assim, as asas anteriores das espécies analisadas refletem o mimetismo no comportamento do voo em conjunto com o padrão da coloração. Além disso, de acordo com as informações de Céspedes *et al.* (2015), o centro da asa anterior é a região que tem maior efeito sobre sua funcionalidade para o voo, porque em algumas espécies, a margem costal da asa posterior pode se sobrepor a asa anterior na região proximal e mesmo assim deixar a maior parte da asa anterior não afetada.

2.5 CONCLUSÃO

As evidências aqui apresentadas corroboraram nossa hipótese de que o mimetismo de coloração de asas entre *H. besckei* e *H. erato phyllis* pode ser estendido para a forma da asa e o comportamento do voo. Assim, podemos hipotetizar que a funcionalidade do voo pode ter sido cooptada para reforçar o padrão convergente de coloração, o que explicaria os padrões observados tanto para a forma como para o tamanho das asas.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Gianfranco Ceni pelo auxílio na realização das fotos utilizadas para as análises e pela elaboração da Figura 1. Ao PPG de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande pelo suporte ofertado durante a realização do trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de doutorado no PPG de Ecologia e Evolução da Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa a BDC e a bolsa de produtividade a GTO 936 (n°307071/2015-4).

REFERÊNCIAS

- Adams D, Collyer M, Kaliontzopoulou A. 2018. Geomorph: software for geometric morphometric analyses. R package version 3.0.6.
- Baxter SW, Papa R, Chamberlain N, Humphray SJ, Joron M, Morrison C, Ffrench-Constant RH, McMillan WO, Jiggins CD. 2008. Convergent evolution in the genetic basis of Müllerian mimicry in *Heliconius* butterflies. *Genetics* **180**: 1567-1577.
- Betts CR, Wootton RJ. 1988. Wing shape and flight behaviour in butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea and Hesperioidea): a preliminary analysis. *Journal of Experimental Biology* **138**: 271-288.
- Cardoso MZ. 2005. New localities for *Heliconius besckei* Ménétriés and *Heliconius sara* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) in Bahia, Brazil. *Neotropical Entomology* **34**: 1007-1008.
- Céspedes A, Penz CM, DeVries PJ. 2015. Cruising the rain forest floor: butterfly wing shape evolution and gliding in ground effect. *Journal of Animal Ecology* **84**: 808-816.
- DeVries PJ, Penz CM, Hill RI. 2010. Vertical distribution, flight behaviour and evolution of wing morphology in Morpho butterflies. *Journal of Animal Ecology* **79**: 1077-1085.
- Dudley R. 2000. *The biomechanics of insect flight: form, function, evolution*. Princeton University Press: Princeton, NJ.
- Jantzen B, Eisner T. 2008. Hindwings are unnecessary for flight but essential for execution of normal evasive flight in Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 16636-16640.
- Jiggins CD. 2017. *The Ecology and Evolution of Heliconius Butterflies*. Oxford University Press: New York.
- Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL, Mallet J. 2001. Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature* **411**: 302-305.
- Jones RT, Poul YL, Whibley AC, Mrot C, Ffrench-Constant RH, Joron M. 2013. Wing shape variation associated with mimicry in butterflies. *Evolution* **67**: 2323-2334.
- Jorge LR, Cordeiro-Estrela P, Klaczko LB, Moreira GRP, Freitas AVL. 2011. Host-plant dependent wing phenotypic variation in the neotropical butterfly *Heliconius erato*. *Biological Journal of the Linnean Society* **102**: 765-774.
- Joron M, Jiggins CD, Papanicolaou A, McMillan WO. 2006a. *Heliconius* wing patterns: an evo-devo model for understanding phenotypic diversity. *Heredity* **97**: 157-167.
- Joron M, Papa R, Beltrn M, Chamberlain N, Mavrez J, Baxter S, Abanto M, Bermingham E, Humphray SJ, Rogers J, Beasley H, Barlow K, Ffrench-Constant RH, Mallet J, McMillan WO, Jiggins CD. 2006b. A conserved supergene locus controls colour pattern diversity in *Heliconius* butterflies. *PLoS Biology* **4**: 1831-1840.
- Klein AL, Araújo AM. 2013. Sexual Size dimorphism in the color pattern elements of two mimetic *Heliconius* butterflies. *Neotropical Entomology* **42**: 600-606.
- Mérot C, Mavrez J, Evin A, Dasmahapatra KK, Mallet J, Lamas G, Joron M. 2013. Genetic differentiation without mimicry shift in a pair of hybridizing *Heliconius* species (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **109**: 830-847.

- Merrill RM, Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'Aglio DD, Hanly JJ, Huber B, Jiggins CD, Joron M, Kozak KM, Llaurens V, Martin SH, Montgomery SH, Morris J, Nadeau NJ, Pinharanda AL, Rosser N, Thompson MJ, Vanjari S, Wallbank RWR, Yu Q. 2015.** The diversification of *Heliconius* butterflies: What have we learned in 150 years? *Journal of Evolutionary Biology* **28**: 1417-1438.
- R-Core-Team. 2017.** R: A language and environment for statistical computing. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing.
- Rohlf FJ. 2015.** The tps series of software. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy Commentary*: 1-4.
- Rossato DO, Boligon D, Fornel R, Kronforst MR, Goncalves GL, Moreira GRP. 2018.** Subtle variation in size and shape of the whole forewing and the red band among co-mimics revealed by geometric morphometric analysis in *Heliconius* butterflies. *Ecology and Evolution* **8**: 3280-3295.
- Rosser N, Freitas AVL, Huertas B, Joron M, Lamas G, Mérot C, Simpson F, Willmott KR, Mallet J, Dasmahapatra KK. 2018.** Cryptic speciation associated with geographic and ecological divergence in two Amazonian *Heliconius* butterflies *Zoological Journal of the Linnean Society* **XX**: 1-17.
- Sheppard PM, Turner JRG, Brown KS, Benson WW, Singer MC. 1985.** Genetics and the Evolution of Müellerian Mimicry in *Heliconius* Butterflies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **308**: 433-610.
- Srygley RB. 1994.** Locomotor mimicry in butterflies? The associations of positions of centres of mass among groups of mimetic, unprofitable prey. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **343**: 145-155.
- Srygley RB, Chai P. 1990.** Flight morphology of Neotropical butterflies: palatability and distribution of mass to the thorax and abdomen. *Oecologia* **84**: 491-499.
- Srygley RB, Ellington CP. 1999.** Discrimination of flying mimetic, passion-vine butterflies *Heliconius*. *Proceeding of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**: 2137-2140.
- Srygley RB, Trans P, Lond RS, Srygley RB. 1999.** Locomotor mimicry in *Heliconius* butterflies: contrast analyses of flight morphology and kinematics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **354**: 203-214.
- Viscosi V, Cardini A. 2012.** Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics : a simplified protocol for beginners. *Plos One* **7**: 1-20.
- Wallbank RWR, Baxter SW, Pardo-Diaz C, Hanly J, Martin SH, Mallet J, Dasmahapatra KK. 2016.** Evolutionary novelty in a nutterfly wing pattern through enhancer shuffling. *PLoS Biology* **14**: 1-16.
- Zhang W, Dasmahapatra KK, Mallet J, Moreira GRP, Kronforst MR. 2016.** Genome-wide introgression among distantly related *Heliconius* butterfly species. *Genome Biology* **17**: 1-15.

CAPÍTULO 3

Manuscrito redigido conforme as normas do periódico *Entomological Science*

Canibalismo em lagartas de *Heliconius erato phyllis*: metabolismo energético e balanço oxidativo

Tiziane Fernandes Molina¹, Aldo Mellender Araújo², Artur Navarro Valgas³
Guendalina Turcato Oliveira¹

1. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Escola de Ciências. Programa de Pós graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade. Avenida Ipiranga, 6 6681, 90619-900. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Genética. Programa de Pós graduação em Genética e Biologia Molecular. Avenida Bento Gonçalves, 9500, 90650-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

3. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Zoologia. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal. Avenida Bento Gonçalves, 9500, 90650-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

* autor correspondente: guendato@pucri.br

RESUMO

A borboleta *Heliconius erato phyllis* tem atividade no sul do Brasil entre os meses de setembro a maio utilizando como planta hospedeira plantas do gênero *Passiflora*. Após esse período de maior atividade, as condições ambientais não são mais favoráveis à atividade, incluindo também consequências como a possível escassez de *Passiflora*. Nesses casos as fêmeas que tem hábito de inspecionar a planta antes da ovoposição evitando colocar ovos próximos, a fim de evitar o canibalismo, acabam por não ter maiores opções de plantas ou regiões da mesma. Sendo assim os ovos ovopositados ficam próximos e as lagartas de 1º instar podem canibalizar o ovo assim que eclodem. Nós investigamos os marcadores bioquímicos de lagartas e pupas de *H. e. phyllis* em relação ao comportamento canibal que apresentam enquanto larvas de 1º instar. Nossos resultados não mostraram diferenças significativas entre animais que apresentaram comportamento canibal e não canibal sobre os marcadores de estresse oxidativo e metabolismo. Contudo, os níveis de colesterol são mais baixos e de GST mais altos em lagartas de 4º instar que não apresentaram o comportamento canibal. Estes resultados são interessantes quando comparamos com os obtidos para o tempo de desenvolvimento por instar, onde os indivíduos que apresentam comportamento canibal sofrem ecdise mais rapidamente do 1º para o 2º instar.

Palavras-chave: canibal, marcadores bioquímicos, ovos, lagartas, Lepidoptera

3.1 INTRODUÇÃO

O canibalismo refere-se à morte e ao consumo de parte ou de todo indivíduo que é da mesma espécie e pode ocorrer em uma variedade de contextos, incluindo oofagia e interações competitivas. As pressões seletivas que favorecem o canibalismo estão associadas com a história e os estágios de vida do canibal e de sua vítima (Elgar & Crespi, 1992; Richardson et al., 2010). Um dos fatores ecológicos que mais favorece o canibalismo é a baixa disponibilidade de alimentos, que pode depender, em vários níveis, da densidade da população. Nessa relação o comportamento do canibalismo pode ocorrer por duas razões principais, para satisfazer suas exigências energéticas ou nutricionais e para recuperar o investimento reprodutivo se as condições são ruins e a prole não é susceptível de sobrevivência.

Lepidoptera e Coleoptera são os grupos que apresentam o maior número de espécies com comportamento canibal dentre os insetos não carnívoros. Em 48 espécies de 15 famílias entre borboletas e mariposas já foram registradas ocorrências de canibalismo. Geralmente nesses casos, as lagartas mais velhas matam e consomem as mais jovens ou os ovos (Richardson et al., 2010).

Consequências fisiológicas do canibalismo ainda são pouco estudadas, mesmo que esta seja uma estratégia adaptativa de forrageamento para animais em várias posições tróficas (Mayntz & Toft, 2006). Assim, investigamos o balanço oxidativo e a composição bioquímica resultante do comportamento de canibalismo exercido por lagartas de *Heliconius erato phyllis*. Essa espécie de borboleta é muito comum no Brasil, voa no sul do país (Estado do Rio Grande do Sul) de setembro/outubro a maio/junho e utiliza como planta hospedeira, especialmente nessas regiões, *Passiflora suberosa* ou *Passiflora misera*. As lagartas de primeiro *instar* dessa espécie podem

apresentar comportamento canibal em relação aos ovos (Brown & Mielke, 1972; De Nardin & Araújo, 2011).

O fim da temporada de voo da espécie é o período em que as plantas estão significativamente mais danificadas por conta da temperatura baixa do inverno e da alimentação das lagartas (De Nardin et al., 2015). Embora esta espécie não possa ser chamada de social (Finkbeiner et al., 2012), nesse período as fêmeas podem facilitar o canibalismo quando ovopositam ovos muito próximos um do outro (De Nardin & Araújo, 2011; De Nardin et al., 2015). Normalmente o comportamento de *H. erato phyllis* é a inspeção cuidadosa da planta antes da ovoposição para evitar a proximidade entre ovos (Benson et al., 1975; Brown, 1981), ou seja, a ovoposição de mais de um ovo na mesma região da planta ocorre pela escassez de plantas.

Os ovos geralmente não têm defesas, são ricos em proteínas e lipídios, e apresentam fácil digestibilidade (Barros-Bellanda & Zucoloto, 2001). Em muitos insetos, é comum que os recém-nascidos consumam seus próprios córions, e este é apenas um pequeno impulso para o consumo de ovos não eclodidos. O córion endurecido passou pelo processo de atividade intensa da Córon-peroxidase (Li et al., 1996). A atividade peroxidásica depende da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Sendo assim, a primeira fonte alimentar dos organismos é formada por pró-oxidantes, além de proteínas (Zago-Braga & Zucoloto, 2004). No entanto, o ovo também é composto por vitelo que fornece nutrientes para o desenvolvimento dos embriões e das larvas. O vitelo é constituído por proteínas, lipídeos, carboidratos e íons inorgânicos, além de lipo e fosfoproteínas que ficam contidos em organelas envolvidas por membranas, chamadas de grânulos de vitelo. Um importante componente dos grânulos de vitelo é a vitelina, uma glicolipoproteína sintetizada a partir da vitelogenina, captada pelos ovócitos em um processo conhecido como vitelogênese. A vitelogenina é

sintetizada no corpo gorduroso das fêmeas de insetos, liberada na hemolinfa e captada pelos ovócitos (Masuda et al., 2012; Sun & Zhang, 2015). Em fêmeas de abelhas reprodutoras, por exemplo, a vitelogenina é uma glicolipoproteína armazenada no corpo gorduroso e geralmente liberada na hemolinfa antes de ser armazenada dentro dos ovócitos (Even et al., 2012). Dessa forma, entende-se que Vtg é também associada ao armazenamento de energia.

As lagartas de *Heliconius* são herbívoras sendo assim, ao se alimentarem de *Passiflora* estão também expostas à ingestão de pró-oxidantes produzidos pela planta como defesa contra herbívoros, dentre elas o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Łukasik et al., 2012), além de flavonoides, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, assim como a presença de taninos e saponinas (Castro et al., 2018). Contudo, os heliconíneos e o gênero *Passiflora* coevoluiram de forma que a ingestão da planta, apesar de possuir inúmeras defesas, não causa prejuízo às borboletas (Castro et al., 2018). A hipótese que temos é de que o sistema antioxidante e/ou o de biotransformação destas borboletas consiga reverter esse aporte pró-oxidante através de mecanismos do próprio organismo fortalecidos em especial em indivíduos que apresentaram o comportamento canibal na espécie *H. erato phyllis*. Além disto, Rudnicki et al. (2007) demonstraram que extratos foliares de *P. alata* e *P. edulis* possuem potentes propriedades antioxidantes *in vitro e ex vivo* de mamíferos, sendo esta atividade antioxidante diretamente correlacionada com o elevado teor de polifenóis presentes nestes extratos.

Nós investigamos os níveis das enzimas que compõem o sistema antioxidante, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), os níveis de dano oxidativo, através da quantificação do ácido tiobarbitúrico (TBARS), além de uma enzima do sistema de biotransformação, a glutathione S-transferase. Avaliamos também a composição bioquímica dos animais através da quantificação das proteínas totais, ácido úrico,

glicogênio, lactato, lipídios totais, triglicerídios e colesterol. Todas as análises foram realizadas em lagartas de 4^o instar e em pupas de 24h.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Borboletas

Fêmeas copuladas de *Heliconius erato phyllis* foram coletadas em três localidades (Campus da UFRGS – Porto Alegre, Viamão na Fepagro e na sede da UFRGS em Eldorado do Sul), sendo assim obtivemos indivíduos de populações diferentes. As fêmeas foram transportadas e mantidas em três viveiros medindo cerca de 2x2x3m localizados em área adjacente ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil (UFRGS). No interior dos viveiros manteve-se o cultivo de diversas plantas a fim de simular as condições naturais, dentre estas inclui-se *Passiflora misera*, *Passiflora suberosa* e *Passiflora capsularis*, plantas hospedeiras de *Heliconius erato phyllis*. As borboletas foram alimentadas diariamente através de pequenos recipientes com mistura de água, mel e pólen. Os testes realizados neste estudo utilizaram a prole destas fêmeas.

Foram realizadas análises químicas para a padronização da alimentação e exatidão dos percentuais dos compostos orgânicos e inorgânicos existentes na dieta ofertada as fêmeas durante o experimento. As análises foram realizadas no Laboratório de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Utilizou-se mel e pólen para o composto da dieta (Aymone et al., 2013; De Nardin & Araújo, 2011). O mel fonte de glicídios é necessário para reserva energética do indivíduo. O pólen, fonte de proteínas está diretamente ligado a fecundidade e longevidade.

Através do método de determinação de cinzas obteve-se o percentual dos constituintes minerais do pólen utilizado, cerca de 2,60%, a quantidade de lípidios do pólen também foi averiguada a partir das técnicas de extração e índice de refração sendo a média da triplicata, 2,38%. O método de determinação do nitrogênio indicou aproximadamente 18,49% de proteínas existente no pólen. Para a determinação da porcentagem de açúcares totais do mel foi utilizada a técnica de Titulação de Fehling e esta correspondeu a 69,06% sendo que estes incluem açúcares redutores e não redutores. A umidade e a quantidade de sólidos do mel também foram avaliadas, no equipamento refratômetro, a média das leituras para os sólidos foi de 77%, sendo o restante tratado como umidade (23%).

As fêmeas utilizaram as folhas de *Passiflora suberosa* para ovopositar e estes ovos eram coletados diariamente, pesados e transferidos para recipientes identificados de acordo com o viveiro em que foi coletado. Logo após, esse procedimento eram destinados aos testes de comportamento de canibalismo.

3.2.2 Testes de comportamento canibal

A fim de obtermos indivíduos canibais e não canibais e podermos avaliar as diferenças fisiológicas em ambos, realizamos testes comportamentais. Para estes testes os ovos foram distribuídos nos vértices de um triângulo equilátero, feito de papel cartolina verde, com comprimentos laterais de 0,5 cm, conforme metodologia aplicada por (De Nardin & Araújo, 2011). Os triângulos de cartolina foram mantidos em placa de petri, com diâmetro de 10 cm e altura de 1,5cm, em temperatura ambiente, sobre papel toalha levemente umedecido para evitar a desidratação dos ovos. Identificamos o verso de um dos vértices do triângulo com uma marca de caneta. Esta identificação foi feita para facilitar o reconhecimento da origem do viveiro em que o ovo foi coletado. Cada

vértice correspondia as letras A, B e C. Os ovos escolhidos para cada teste, eram geralmente não irmãos, pois de acordo com a literatura (De Nardin & Araújo, 2011; De Nardin et al., 2015), ovos irmãos apresentam menor porcentagem de ocorrência de canibalismo. A duração dos testes foi de 45 minutos a 1 hora, a partir da emergência da primeira lagarta. Testes em que não foi possível identificar o indivíduo canibal foram descartados.

3.2.3 Lagartas

Sabendo que o tamanho do corpo do adulto varia entre e dentro de populações de *Heliconius erato* (Benson et al., 1975) e que esta variação de tamanho entre populações é devido a diferenças na abundância de planta hospedeira e de qualidade entre localidades para as larvas (Rodrigues & Moreira, 2002), teve-se o cuidado quanto ao controle do alimento ofertado as larvas, tanto na quantidade quanto no tipo de *Passiflora sp.* A fim de diminuir o número de fatores que pudessem interferir no tamanho das larvas e das pupas, as lagartas foram alimentadas, individualmente, somente com *Passiflora suberosa ad libitum* e foram mantidas em temperatura entre 24-26°C e a umidade entre 70-75%. As lagartas foram mantidas individualizadas, acondicionadas em recipientes identificados com o tipo de comportamento que apresentaram canibal (C) ou não canibal (NC). Além disso, a manutenção dos recipientes era realizada diariamente, para limpeza e renovação da alimentação. Durante a manutenção era conferido o instar no qual a lagarta estava e anotado no recipiente, assim controlamos também o tempo que cada indivíduo permaneceu em determinado estágio. Foi calculada também a taxa de crescimento (R) pela fórmula dada por Smiley (1987): $R = ((\text{massa da pupa}/\text{massa do ovo}) * 1/5) - 1 / (\text{total de dias de desenvolvimento}/5)$.

3.2.4 Análises do metabolismo energético

As análises dos parâmetros metabólicos e do balanço oxidativo foram realizadas com lagartas de 4^o *instar* e pupas de 24h. Estas foram pesadas, crioanestesiadas e destinadas aos testes. Para as lagartas realizamos as análises em pools de 2 lagartas, para as pupas foram feitas individualmente. As análises dos parâmetros metabólicos envolveram a quantificação dos níveis de proteínas totais, ácido úrico, glicogênio, lactato, lipídios, triglicerídeos e colesterol.

A extração do glicogênio seguiu o método de Handel (1965), sendo quantificado como glicose após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (Na₂CO₃) utilizando-se o kit da Labtest (glicose PAP Liquiform), segundo o método da glicose oxidase. As proteínas foram quantificadas segundo método descrito por Beyer (1983) através de Kit da Labtest. O ácido úrico foi determinado através do Kit da Labtest (Ácido Úrico Liquiform); para a quantificação do lactado também foi usado Kit comercial da labtest. Os lipídios, triglicerídios e colesterol teciduais foram extraídos pelo método do clorofórmio e metanol, na proporção 2:1, segundo o método de Folch et al. (1957). A dosagem de lipídios totais se deu conforme o método descrito por (Frings & Dunn, 1970) e a do colesterol total conforme o kit da Labtest (Colesterol Total Liquiform). Os triglicerídeos tiveram dosagem determinada através do kit da Labtest (Triglicerídeos GPO-ANA). Todos os resultados foram expressos em mg/g.

3.2.5 Análises do balanço oxidativo

O balanço oxidativo foi analisado através das determinações de TBARS e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além da enzima de biotransformação a glutathione S-transferase (GST). Todos os parâmetros foram quantificados em quadruplicata para cada animal.

O ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizado para a determinação da lipoperoxidação (LPO), sendo esta técnica utilizada para medir o nível de dano dos lipídios da membrana, já que o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos. A determinação segue modificações propostas por Lima & Abdalla (2001). A concentração de TBARS está expressa em $\mu\text{moles. mg de proteínas}^{-1}$. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo descrito por Boveris et al. (1983), sendo expressa em unidades por mg de proteínas por minuto. A atividade da enzima catalase foi medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio, sendo a decomposição do peróxido de hidrogênio proporcional a atividade da catalase. Dessa forma, a (Boveris & Chance, 1973). Os resultados estão expressos em $\text{pmoles de H}_2\text{O}_2. \text{minuto}^{-1}. \text{mg de proteínas}^{-1}$. A atividade da glutathione S-transferase foi medida pelo método de Boyland & Chasseaud (1969) e expressa em $\mu\text{moles de CDNB. mg de proteínas}^{-1}. \text{minuto}^{-1}$.

3.2.6 Análises estatísticas

Os dados foram analisados no programa SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA, 2008) e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Para analisar a massa corporal das lagartas e das pupas utilizamos Teste t, dada a normalidade dos dados (de acordo com o teste de Shapiro-Wilk). O tempo que os indivíduos permaneceram em cada instar também foi analisado através de Teste t. Para a análise dos metabólitos ligados ao metabolismo intermediário, dado que estes apresentavam distribuição normal, utilizamos a análise de variância multivariada (MANOVA), em que os comportamentos, canibal (C) e não canibal (NC) foram às variáveis independentes, e cada um dos biomarcadores de metabolismo intermediário constituíram as variáveis dependentes. A análise do balanço oxidativo também foi feita por MANOVA, onde as enzimas e o dano oxidativo foram às variáveis dependentes. O

teste de Bonferroni foi utilizado para os testes par a par, tanto em relação aos metabólitos, quanto ao balanço oxidativo.

3.3 RESULTADOS

Todas as análises foram realizadas comparando indivíduos que enquanto lagartas de 1º instar apresentaram o comportamento canibal e indivíduos que não apresentaram esse comportamento. A massa dos ovos não difere entre os grupos, assim como a massa corporal das de lagartas de 4º instar e de pupas (Figura 1). Quando comparamos a quantidade de dias que os indivíduos permaneceram em cada *instar*, registramos que as lagartas de 1º instar que apresentaram comportamento canibal passam mais rapidamente para o 2º instar (Mann Whitney $p= 0,005$) em relação ao grupo que não teve o comportamento canibal. Em todos os outros episódios de ecdise não houve diferença entre os grupos (não canibal e canibal). Também não registramos diferenças entre a taxa de crescimento entre os grupos ambos mantêm a mesma taxa de crescimento (Figura 2).

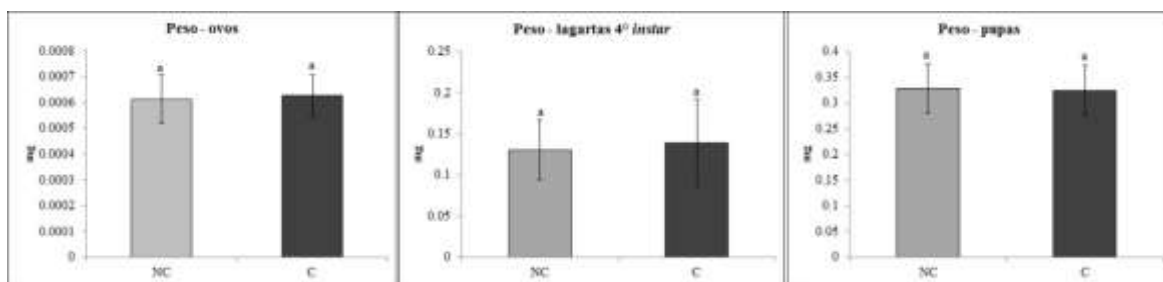


Figura 1. Massa de ovos, de lagartas e de pupas. Barras cinza claro (NC) representam indivíduos que não apresentaram o comportamento canibal enquanto lagarta de 1º instar e barras cinza escuro (C) representam os indivíduos que apresentaram este comportamento. Barras representam as médias \pm desvio padrão.

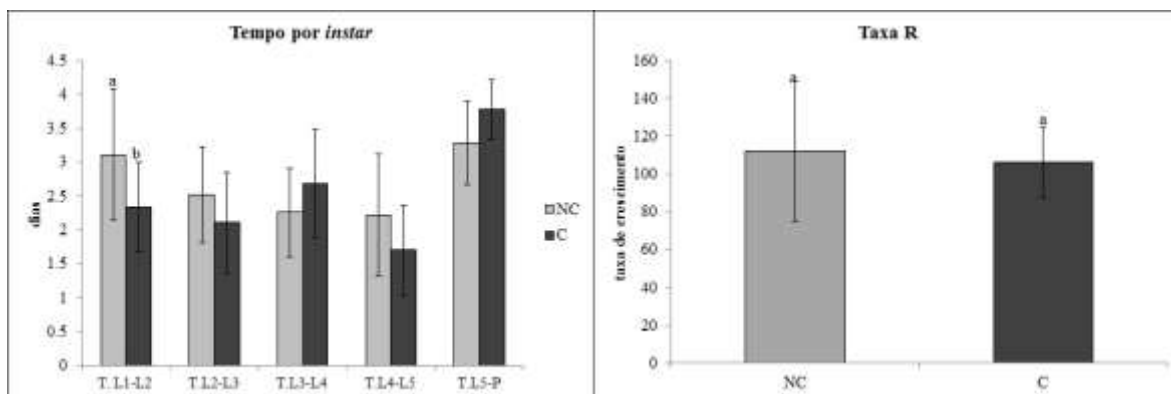


Figura 2. Média de tempo (em dias) por *instar* e taxa de crescimento por grupo. Barras cinza claro (NC) representam indivíduos que não apresentaram o comportamento canibal enquanto lagarta de 1° instar e barras cinza escuro (C) representam os indivíduos que apresentaram este comportamento. Barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras representam indicam diferença estatística entre os valores médios, para um $p < 0,05$.

Os níveis de proteínas totais, ácido úrico, glicogênio e lactato não foram influenciados pela ocorrência de oofagia no 1° instar larval. Isto também ocorreu para a concentração de lipídios totais, triglicerídeos e colesterol, tanto em lagartas de 4° *instar* quanto para pupas (Figuras 3 e 4).

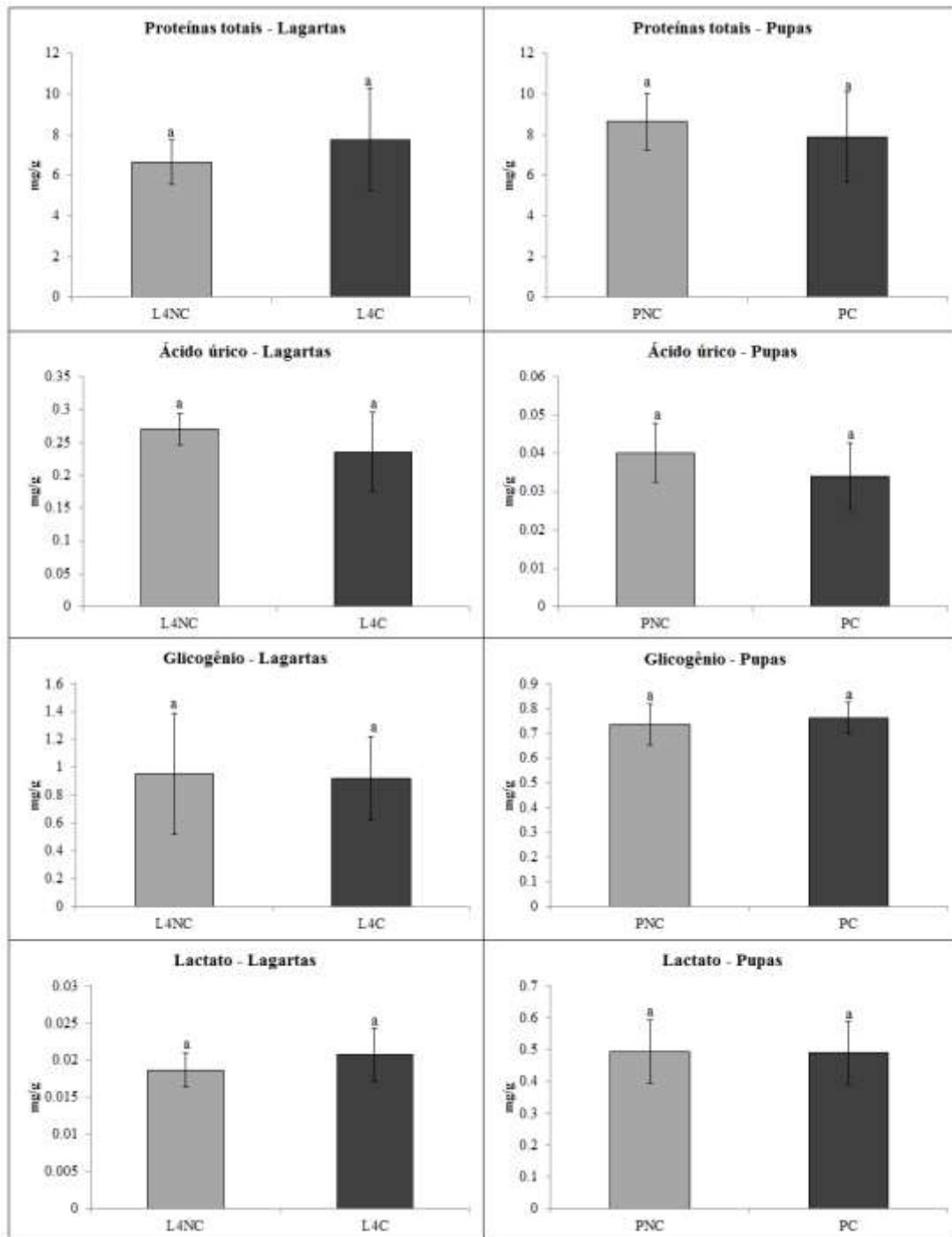


Figura 3. Níveis de Proteínas totais, ácido úrico, glicogênio e lactato por grupo. Barras cinza claro representam indivíduos que não apresentaram o comportamento canibal enquanto lagarta de 1° instar e barras cinza escuro representam os indivíduos que apresentaram este comportamento. Barras representam as médias \pm desvio padrão. Legenda: L4C – lagartas que apresentaram comportamento canibal no 1° instar. L4NC – lagartas que não apresentaram comportamento canibal no 1° instar. PC – pupas de indivíduos canibais e PNC – pupas de indivíduos não canibais.

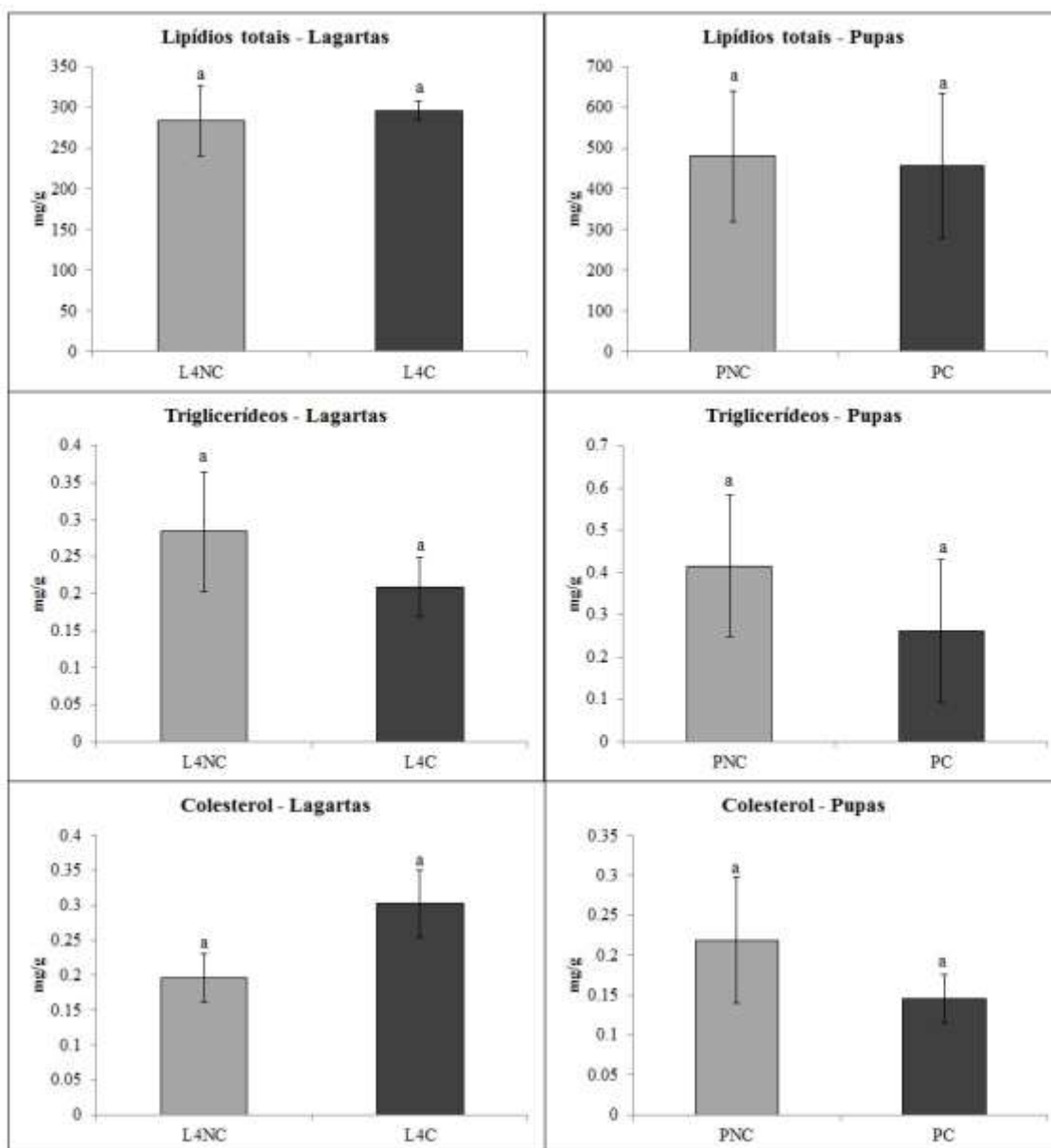


Figura 4. Níveis de lipídios totais, triglicerídeos e colesterol. Barras cinza claro representam indivíduos que não apresentaram o comportamento canibal enquanto lagarta de 1° *instar* e barras cinza escuro representam os indivíduos que apresentaram este comportamento. Barras representam as médias \pm desvio padrão. Legenda: L4C – lagartas que apresentaram comportamento canibal no 1° *instar*. L4NC – lagartas que não apresentaram comportamento canibal no 1° *instar*. PC – pupas de indivíduos canibais e PNC – pupas de indivíduos não canibais.

Assim como para os parâmetros de metabolismo energético, os biomarcadores do balanço oxidativo, TBARS, SOD, CAT e GST não apresentaram diferenças entre os grupos (Figura 5).

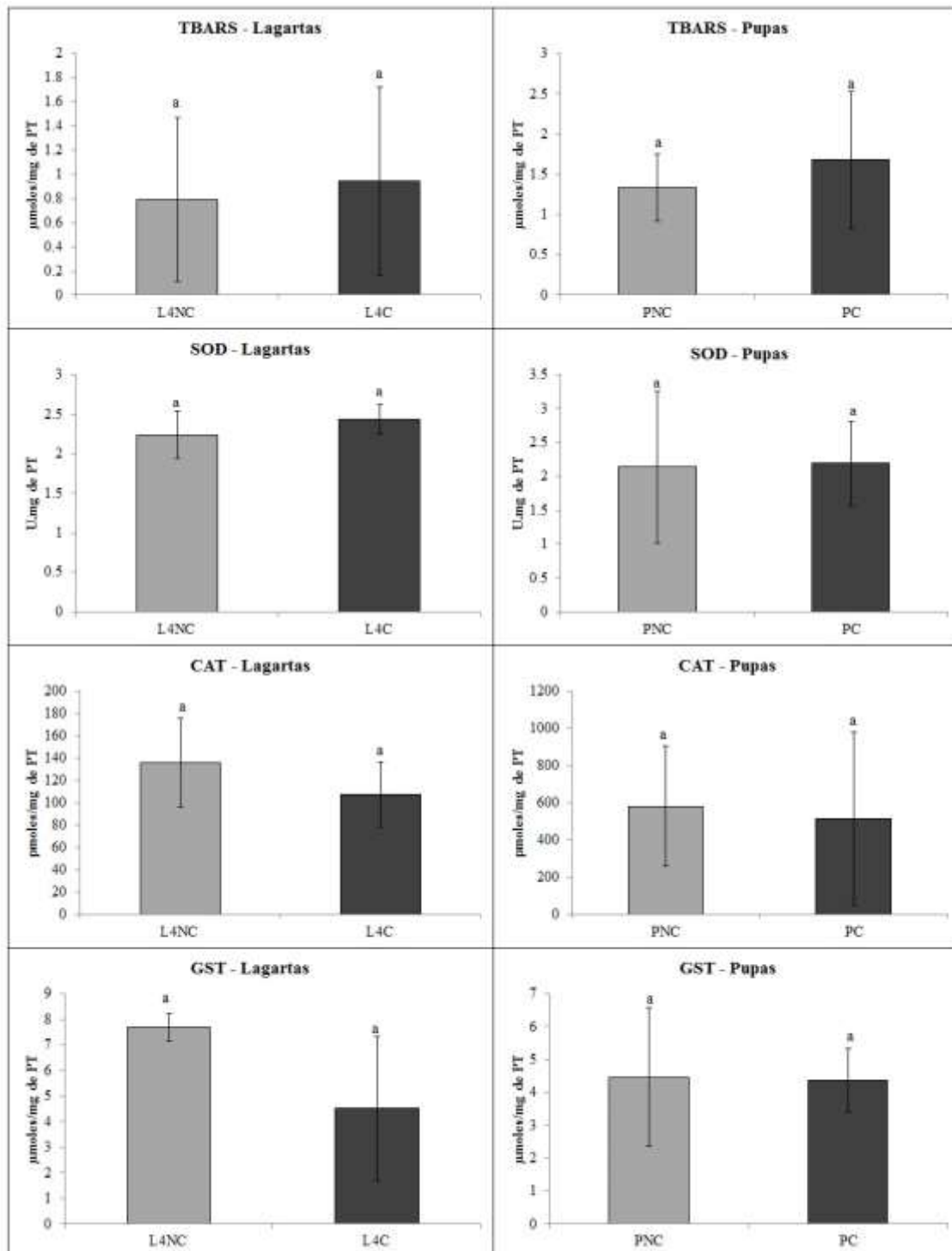


Figura 5. Níveis de TBARS, SOD, CAT e GST. Barras cinza claro representam indivíduos que não apresentaram o comportamento canibal enquanto lagarta de 1^o instar e barras cinza escuro representam os indivíduos que apresentaram este comportamento. Barras representam as médias ± desvio padrão. Legenda: L4C – lagartas que apresentaram comportamento canibal no 1^o instar. L4NC – lagartas que não apresentaram comportamento canibal no 1^o instar. PC – pupas de indivíduos canibais e PNC – pupas de indivíduos não canibais.

3.4 DISCUSSÃO

Ambrosen & Petersen (1997) sugerem que os benefícios nutricionais da ingestão do ovo pelas lagartas (canibais) podem prover uma fonte de energia não disponível aquelas não canibais favorecendo seu desenvolvimento. As lagartas de 1° *instar* de *Heliconius erato phyllis* que canibalizam o ovo estão ingerindo compostos muito diferentes dos constituintes da planta hospedeira (*Passiflora*). As lagartas que se alimentam dos ovos da mesma espécie podem obter no primeiro momento de vida, relações Nitrogênio/Carbono maiores do que se houvesse alimentação de outra forma. Além disso, o conteúdo bioquímico de conspécíficos é bastante diferente da dieta normalmente utilizada e isto pode ser nutricionalmente vantajoso (Mayntz & Toft, 2006). Isto corrobora com os nossos resultados de tempo de desenvolvimento por instar.

As lagartas que canibalizaram ovos apresentaram desenvolvimento mais rápido, passando para o 2° *instar*, em média, aproximadamente dois dias antes dos indivíduos que não foram canibais. Essa diferença de tempo possibilita vantagens quanto à alimentação em outras regiões da planta hospedeira, visto que o aparelho bucal das lagartas ao longo do estágio se desenvolve e se fortifica (Kaminski et al., 2002). Alguns autores também relatam que o canibalismo aumenta a taxa de crescimento de larvas que comem ovos (Agarwala & Dixson, 1992; Dickinson, 1992). Além disso, Osawa (1992) afirmou que as larvas de primeiro ínstar da joaninha, *Harmonia axyridis Pallas*, se desenvolveram mais rapidamente depois de comerem ovos específicos.

A relação positiva entre a ingestão do ovo e o menor tempo de desenvolvimento no 1° *instar* pode também corroborar com os níveis de colesterol menores que registramos nas lagartas de 4° instar. Apesar da comparação sobre os níveis de colesterol entre os grupos não apresentar significância estatística, estes resultados corroboram com o tempo de desenvolvimento nesta faixa, de 4° para 5° instar. Nesse

momento, as lagartas que apresentaram comportamento canibal também são mais rápidas em realizar a ecdise do que as não canibais. A ecdise é desencadeada após um aumento no nível de ecdisona, hormônio de muda, que é sintetizada a partir do colesterol. O colesterol e os fitoesteróis são substratos essenciais para a síntese dos ecdisteróides nas glândulas protorácicas dos insetos. Nos insetos carnívoros, o colesterol pode ser absorvido e utilizado diretamente (Enya et al., 2014). *H. erato phyllis* não é classificada como carnívora, no entanto, enquanto canibaliza o ovo se comporta como tal. Nestas circunstâncias uma maior quantidade de colesterol é absorvida e transportada do intestino médio para cada tecido, através da hemolinfa da lagarta.

Não registramos diferenças entre a massa dos ovos e a taxa de crescimento, entre os grupos canibais e não canibais, de lagartas de 4º instar e de pupas. Em *Pieris rapae crucivora* também não houve diferenças significativas entre as larvas canibalizantes e não-canibalizantes ao longo de todo o período larval em relação ao tamanho e peso dos adultos, ou fecundidade das fêmeas (Watanabe & Oh'ura, 1997).

Apesar de não registramos influência nos níveis de proteínas totais, bem como dos outros componentes bioquímicos (ácido úrico, glicogênio, lactato, lipídios totais e triglicerídeos) entre os grupos testados, a dieta dos organismos canibais em relação aos não canibais foi heteroespecífica. Isto se deve à ingestão de uma fonte de nutrientes que não é a mesma que a dos indivíduos não canibais, o que parece acelerar o tempo de desenvolvimento do animal. A carga extra de nutrientes fornecidas pela ingesta do ovo estaria sendo utilizada para acelerar o desenvolvimento do animal determinando assim, esta ausência de variação nos marcadores de composição bioquímicos aqui observados.

Da mesma forma nossos resultados sobre o balanço oxidativo (TBARS, SOD, CAT e GST) também não apresentaram diferença significativa entre os grupos

experimentais (canibais e não canibais). Contudo, não podemos descartar que este aporte de vitelo ingerido pelos indivíduos canibais possa contribuir para capacitar o sistema antioxidante e de biotransformação do organismo frente, por exemplo, a diferentes tipos de estresse. Experimentos futuros visando testar hipótese devem ser delineados. Visto que as funções da vitelogenina se estendem além da nutrição, existem inúmeros estudos que mostram que ela participa da defesa imune e consegue agir como receptor de reconhecimento, capaz de identificar microorganismos invasores, além de também ter atividade antioxidante, que é capaz de proteger o hospedeiro de estresse oxidativo (Sun & Zhang, 2015). As reservas de vitelogenina podem explicar a longevidade de muitos insetos, como por exemplo, as abelhas rainhas (Even et al., 2012). Já foi relatado também que ela é capaz de reconhecer os danos celulares através de sua ligação à membrana e protegendo células vivas de danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Havukainen et al., 2013). No entanto, a ingestão de ovos através do comportamento de canibalismo em *H. erato phyllis* é pouca, e raramente excede mais de um ovo nas primeiras horas de vida. Isto pode ser fator determinante para não registrarmos significância nos níveis registrados em lagartas de 4^o instar já que grande parte do aporte energético já foi gasto no desenvolvimento e nas atividades. Outra hipótese a se considerar foi à maior velocidade de desenvolvimento entre o primeiro e o segundo instar que pode conduzir a uma maior demanda metabólica e maior tendência de estresse oxidativo, exaurindo assim as reservas/benefícios ganhos com o canibalismo, mas beneficiando a lagarta na escolha de um microhabitat mais favorável para seu desenvolvimento, como citado por Kaminski et al. (2002) e Watanabe & Oh'ura (1997). Apesar disso, a ingestão do ovo, além de benefícios na competição por alimento e espaço, pode representar benefício fisiológico para *H. erato phyllis*, principalmente nos primeiros instares. Estudos futuros devem ser delineados

para avaliar as consequências fisiológicas principalmente nestes instares, visto que em instares mais afastado do comportamento canibal não registramos influência nos parâmetros testados.

AGRADECIMENTOS

Ao PPG de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por disponibilizar o espaço para o cultivo dos indivíduos adultos e das lagartas. Dra Janaína De Nardin pela ajuda na confecção dos testes e discussão sobre métodos e resultados. Às colegas do Laboratório de Genética Ecológica da UFRGS, Mestres Aline Maciel e Etiele Senna e a Bióloga Natasha Magni pelo auxílio na criação das lagartas e adultos dos indivíduos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de doutorado no PPG de Ecologia e Evolução da Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa a BDC e a bolsa de produtividade a GTO 936 (n°307071/2015-4).

REFERÊNCIAS

- Agarwala, B.K., Dixson, A.F.G., 1992. Laboratory study of cannibalism and interspecific predation in ladybirds. *Ecological Entomology* 17, 303-309.
- Ambrosen, T., Petersen, V.E., 1997. Ambrosen, T. & Petersen, V.E., 1997. The influence of protein level in the diet on cannibalism and quality of plumage of layers. *Poultry Science*, 76(4), pp.559–563. *Poultry Science* 76, 559-563.
- Aymone, A.C.B., Valente, V.L.S., Araújo, A.M., 2013. Ultrastructure and morphogenesis of the wing scales in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae): What silvery/brownish surfaces can tell us about the development of color patterning? *Arthropod Structure & Development* 42, 349-359.

- Barros-Bellanda, H.C.H., Zucoloto, F.S., 2001. Influence of chorion ingestion on the performance of *Ascia monuste* and its association with cannibalism. *Ecological Entomology* 26, 557-561.
- Benson, W.W., Brown, K.S., Gilbert, L.E., 1975. Coevolution of plants and herbivores : passion flower butterflies. *Evolution* 29, 659-680.
- Beyer, R.E., 1983. A rapid biuret assay for protein of whole fatty tissues. *Analytical Biochemistry* 129, 483-485.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 34, 707-717.
- Boveris, A., Fraga, C.G., Varsaysky, A.I., Koch, O.R., 1983. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 227, 534-541.
- Boyland, E., Chasseaud, L.F., 1969. The role of glutathione and glutathione Stransferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 32, 173-219.
- Brown, K.S., 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual Review of Entomology* 26, 427-457.
- Brown, K.S.J., Mielke, O.H.H., 1972. The heliconians of Brazil (Lepidoptera; Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary revision of the tribe. *Zoologica* 57, 1-40.
- Castro, E.C.P., Zagrobelny, M., Cardoso, M.Z., Bak, S., 2018. The arms race between heliconiine butterflies and *Passiflora* plants – new insights on an ancient subject. *Biological Reviews* 93, 555-573.
- De Nardin, J., Araújo, A.M., 2011. Kin recognition in immatures of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Journal of Ethology* 29, 499-503.
- De Nardin, J., Missaggia, B.O., Araújo, A.M., 2015. An experimental approach to test the source of information on kinship in butterfly immatures. *Ethology Ecology & Evolution* 27, 294-305.
- Dickinson, J.L., 1992. Egg cannibalism by larvae and adult of the milkweed leaf beetle (*Labidomera clivicollis*, Coleoptera: Chrysomelidae). *Ecological Entomology* 17, 209-218.
- Elgar, M.A., Crespi, B.J., 1992. *Cannibalism: Ecology and Evolution Among Diverse Taxa*. Oxford University Press, United Kingdom.

- Enya, S., Ameku, T., Igarashi, F., Iga, M., Kataoka, H., Shinoda, T., Niwa, R., 2014. A Halloween gene noppera-bo encodes a glutathione S-transferase essential for ecdysteroid biosynthesis via regulating the behaviour of cholesterol in *Drosophila*. *Scientific Reports* 4, 1-10.
- Even, N., Devaud, J.-M., Barron, A.B., 2012. General stress responses in the honey bee. *Insects* 3, 1291-1298.
- Finkbeiner, S.D., Briscoe, A.D., Reed, R.D., 2012. The benefit of being a social butterfly: communal roosting deters predation. *Proceedings of the Royal Society B* 279, 2769-2776.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Frings, C.S., Dunn, R.T., 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulphophospho-vanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology* 53, 89-91.
- Handel, E.V., 1965. Microseparation of glycogen, sugar, and lipids. *Analytical Biochemistry* 11, 266-271.
- Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, Ø., Krogsgaard, M., Amdam, G.V., 2013. Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species. *The Journal Of Biological Chemistry* 288, 28369–28381.
- Kaminski, L., Tavares, M., Ferro, V.G., Moreira, G.R.P., 2002. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais. III. *Heliconius erato phyllis* (Fabricus) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). *Revista Brasileira de Zoologia* 19, 977-993.
- Li, J., Hodgeman, B.A., Christensen, B.M., 1996. Involvement of peroxidase in chorion hardening in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26, 309-317.
- Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 37, 293-303.
- Łukasik, I., Goławska, S., Wójcicka, A., 2012. Effect of host plants on biochemical markers of oxidative stress within tissues of pea aphid. *Journal of Plant Protection Research* 52, 59-63.

- Masuda, H., Ramos, I.B., Winter, C.E., 2012. Vitelogênese nos ecdisozoa: nematoides e insetos como exemplos, in: Neto, M.A.C.d.S., Winter, C., Termignoni, C., Vaz-Junior, I.d.S. (Eds.), *Topicos avançados em entomologia molecular*. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, pp. 1-45.
- Mayntz, D., Toft, S., 2006. Nutritional value of cannibalism and the role of starvation and nutrient imbalance for cannibalistic tendencies in a generalist predator. *Journal of Animal Ecology* 75, 288-297.
- Osawa, N., 1992. Sibling cannibalism in the ladybird beetle *Harmonia axyridis*: fitness consequences for mother and offspring. *Researches on Population Ecology* 34, 45-55.
- Richardson, M.L., Mitchell, R.F., Reagel, P.F., Hanks, L.M., 2010. Causes and consequences of cannibalism in noncarnivorous insects. *Annual Review of Entomology* 55, 39-53.
- Rodrigues, D., Moreira, G.R.P., 2002. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) and consequences for adult life history. *Brazilian Journal of Biology* 62, 321-332.
- Rudnicki, M., Oliveira, M.R., Pereira, T.d.V., Reginatto, F.H., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., 2007. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry* 100, 719-724.
- Smiley, J.T., 1987. The host plant ecology of *Heliconius* butterflies in Northeastern Costa Rica. University of Texas, Austin, p. 198.
- Sun, C., Zhang, S., 2015. Immune-relevant and antioxidant activities of vitellogenin and yolk proteins in fish. *Nutrients* 7, 8818-8829.
- Watanabe, M., Oh'ura, T., 1997. Egg cannibalism by newly hatched larvae of the small white butterfly, *Pieris rapae crucivora* (Pieridae), on an artificial diet. *Journal of the Lepidopterists' Society* 51, 304-315.
- Zago-Braga, R.C., Zucoloto, F.S., 2004. Cannibalism studies on eggs and newly hatched caterpillars in a wild population of *Ascia monuste* (Godart) (Lepidoptera, Pieridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 48, 415-420.

CAPÍTULO 4

Manuscrito redigido no formato *Research Article* para o periódico *Physiological*

Entomology

Efeito da temperatura sobre o metabolismo intermediário e o balanço oxidativo em lagartas de *Heliconius ethilla narcaea*

Tiziane Fernandes Molina¹, Aldo Mellender Araújo², Guendalina Turcato Oliveira^{1*}

1. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Escola de Ciências. Programa de Pós graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade. Avenida Ipiranga, 6 6681, 90619-900. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Genética. Programa de Pós graduação em Genética e Biologia Molecular. Avenida Bento Gonçalves, 9500, 90650-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *autor correspondente: aldo1806@gmail.

* Autor correspondente: guendato@puers.br

Título resumido: Efeitos fisiológicos da temperatura em *Heliconius ethilla narcaea*

RESUMO GRÁFICO

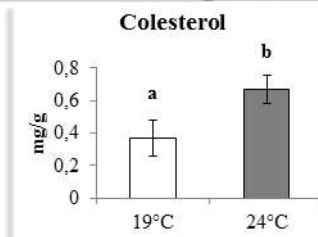
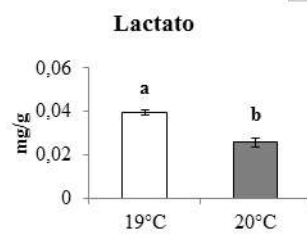
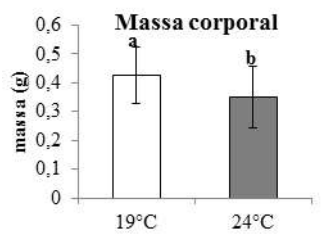
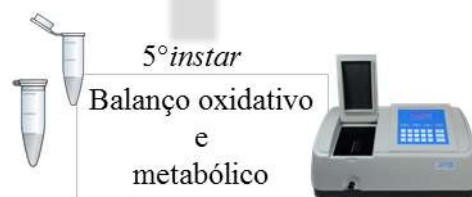


Heliconius ethilla narcaea



19°C

24°C



CAT 19°C
 SOD Não apresentaram diferenças
 GST
 TBARS 24°C

RESUMO

A borboleta *Heliconius ethilla narcaea* que habita o sul do Brasil, participa de diversos anéis miméticos, tanto com espécies do mesmo gênero, quanto de outros. No sul do país, as populações da espécie são bem estabelecidas em diferentes áreas, apesar da variação de temperatura que ocorre entre elas e durante as estações do ano. Diante disso, investigamos parâmetros fisiológicos de lagartas de *H. ethilla narcaea* em duas temperaturas (19 e 24°C), correspondentes aos meses de primavera características de duas localidades (São Francisco de Paula e Porto Alegre/RS), onde a espécie ocorre. As análises realizadas sobre os biomarcadores do metabolismo intermediário (proteínas totais, ácido úrico, glicogênio, lipídios e triglicerídeos) não apresentaram diferenças significativas, bem como as do balanço oxidativo. No entanto, os níveis de lactato e a massa corporal das lagartas foram maiores a 19°C, enquanto que os níveis de colesterol foram maiores nas lagartas mantidas na temperatura mais alta (24°C). Os níveis mais altos de lactato nas lagartas criadas a 19°C podem estar relacionados com uma maior atividade de forrageio e/ou pelo uso de trealose estocada no corpo gorduroso a fim de manter a atividade nestas lagartas gerando possivelmente lactato. O incremento de colesterol em temperaturas mais elevadas pode estar relacionado a uma maior necessidade de moléculas estruturais e a síntese de ecdisona para sustentar um aumento da velocidade de desenvolvimento; o que é corroborado pela menor massa corporal atingida pelas lagartas. Em ambas as temperaturas, as reservas energéticas (glicogênio, triglicerídeos e proteínas) foram mantidas. Estes resultados sugerem que as borboletas respondem às condições quentes ajustando sua atividade metabólica e priorizando através da ingestão e acúmulo de moléculas antioxidantes oriundas do alimento (*Passiflora edulis*); evitando assim um desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes, ou seja, uma situação de estresse oxidativo. Isto reflete a plasticidade fisiológica dos indivíduos da espécie que habitam diferentes lugares com diferentes climas e conseguem manter suas populações por longos períodos do ano.

Palavras-chave: Borboletas; Estresse oxidativo; Lagartas; Metabolismo intermediário; Variação de temperatura

4.1 INTRODUÇÃO

A maioria das populações de borboletas apresenta flutuações de acordo com a variação de temperatura que alteram os padrões de alimentação, desenvolvimento e reprodução. As borboletas *Heliconius* (Kluk, 1780) exibem oscilações no tamanho populacional em regiões subtropicais (Sobral-Souza *et al.*, 2015). Sabe-se que nas regiões sul e sudeste do Brasil ocorrem declínios no número de indivíduos durante o inverno e o tamanho populacional se reestabelece a partir da primavera (Ramos & Freitas, 1999). Isto se deve as alterações climáticas locais que podem fazer com que os indivíduos oscilem devido aos hábitos especializados que mantém, e que por consequência das adversidades do ambiente não conseguem exercer (Ehrlich & Gilbert, 1973; Berryman, 1996). Apesar de todas as possibilidades intrigantes que possam existir a cerca da interação das espécies de *Heliconius* com o fator abiótico de temperatura, esta temática recebeu pouca ou nenhuma atenção quanto às implicações fisiológicas. Este trabalho foi realizado com base nessa necessidade de obtenção de dados sobre a espécie *H. ethilla narcaea* e sobre a interação desta com a temperatura no sul do Brasil.

Os processos fisiológicos que explicam os caminhos que conduzem os organismos a responder a condições adversas ou se adaptar as mudanças ambientais podem ser compreendidos também através do estudo do metabolismo intermediário. O metabolismo intermediário consiste em uma série de processos bioquímicos complexos, dos quais os insetos fazem uso na tentativa de equilibrar a homeostasia (Ramzi *et al.*, 2018). O nível de nutrientes que se acumula no corpo dos insetos é responsável por mudar vários aspectos importantes da vida do animal, como a taxa de crescimento, o tempo de metamorfose e o desenvolvimento (Mirth & Riddiford, 2007) armazenando ou liberando componentes centrais para esses eventos.

Os insetos gastam energia constantemente, e se não estão se alimentando devem ter reservas acumuladas em períodos de abundância de alimento. O glicogênio e os triglicerídios são reservas de energia em células animais. O glicogênio pode ser facilmente degradado sob demanda para ser usado como um combustível glicolítico (Arrese & Soulages, 2010). Já os ácidos graxos armazenados como triglicerídeos podem ser utilizados para a produção de energia através da β -oxidação (Athenstaedt & Daum, 2006).

Os insetos possuem um tipo de tecido solto e geralmente disposto em lóbulos finos que são banhados por hemolinfa, o que é vital para o organismo se ajustar adequadamente às mudanças na concentração de energia dos precursores em circulação (Arrese & Soulages, 2010). Este tecido está distribuído por todo o corpo, preferencialmente sob o tegumento, em torno do intestino e do órgão reprodutivo; sendo conhecido também, como corpo gorduroso. Os tipos celulares encontrados neste tecido atuam como local de reserva e síntese de proteínas, carboidratos e lipídios. Contudo, os triglicerídeos são o principal componente das gotículas lipídicas e, no período de alimentação essas gotículas ocupam a maior parte do espaço intracelular, juntamente com glicogênio e com grânulos de proteína (Dean *et al.*, 1985).

O armazenamento de ácidos graxos, na forma de triglicerídeos, e de glicose são as reservas mais importantes utilizadas pelos insetos para em vários aspectos incluindo a síntese de quitina, que é o componente principal da cutícula (Lockey, 1988) e para a síntese de álcoois de açúcar, que são necessários para a adaptação ao frio (Storey, 1997) ou à seca (Watanabe *et al.*, 2002). Os ácidos graxos servem como precursores de eicosanóides e feromônios e são necessários em quantidades substanciais para a síntese de fosfolipídios e ceras importantes na impermeabilização da cutícula (Lockey, 1988).

Já os aminoácidos, constituintes das proteínas, são derivados da dieta dos insetos e têm funções importantes que incluem a síntese de proteínas estruturais do corpo e do tegumento, síntese de hormônios e de enzimas que participam de reações metabólicas, sendo que alguns aminoácidos também participam da síntese de ácidos nucleicos.

As análises realizadas neste trabalho também estão relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e em como essa produção pode afetar o indivíduo. Em proporções equilibradas, a natureza altamente reativa desses compostos é empregada em muitos processos celulares (Hermes-Lima, 2004). As ERO são formadas continuamente como subprodutos da respiração mitocondrial. No entanto, as temperaturas mais altas aumentam a taxa metabólica dos organismos, o que acarreta na geração de mais ERO do que naturalmente é produzido. Essa produção exacerbada pode ser prejudicial ao organismo, uma vez que as ERO deixam de participar de várias vias celulares vitais e comprometem o controle e a sinalização redox, causando o estresse oxidativo (Jones, 2006). Para balancear o aumento de produção de ERO, é acionado o sistema antioxidante, tanto seu componente enzimático como o não enzimático. O gerenciamento ocorre tanto na atividade pró-oxidante quanto nas redes de sinalização mediadas por ERRO (Hermes-Lima, 2004).

Várias enzimas antioxidantes têm sido caracterizadas em insetos, como superóxido dismutase, catalase ou glutathione peroxidase (Hermes-Lima, 2004; Jia *et al.*, 2011; Beaulieu *et al.*, 2015). A Superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido ($O_2^{\cdot -}$) radical em oxigênio molecular (O_2), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A Catalase (CAT) remove H_2O_2 apenas em altas concentrações celulares, porque seu alto valor de K_m reduz a eficiência em baixos níveis de H_2O_2 (Ahmad, 1995). Glutathione é um poderoso antioxidante e fonte de tióis. É também um cofactor enzimático e tem uma função de desintoxicação, o que a torna um dos mais importantes

antioxidantes intracelulares (Perc-Mataruga *et al.*, 2018). A maioria dos estudos sobre defesa antioxidante mede as respostas dos insetos frente à exposição a pró-oxidantes de plantas, inseticidas ou poluentes.

O estado do Rio Grande do Sul, na região sul do Brasil, apresenta clima oceânico (Cfa) e clima oceânico temperado (Cfb) com as quatro estações com temperaturas bem características (Köppen, 1936). As temperaturas variam desde muito baixas, características do inverno rigoroso a muito altas, no verão (mais amenas nas regiões de maior altitude). A variação de precipitação no estado também varia de acordo com as regiões (Alvares *et al.*, 2013). Por apresentar Floresta de Mata Atlântica na sua composição, a região também é considerada *hotspot* de biodiversidade, o que reforça a necessidade de conhecer a biologia de espécies que habitam o local (Ribeiro *et al.*, 2011). Nestas condições de temperatura, do sul do Brasil, a subespécie de *H. ethilla* que ocorre é *H. ethilla narcaea* (Godart, 1819) (Holzinger & Holzinger, 1994).

Em levantamento populacional já foi registrado que a população de *H. ethilla narcaea* diminui em número até a ausência total em quase toda a segunda metade do ano na região sudeste do Brasil (Andrade & Freitas, 2005). A acentuada variação no número de indivíduos nesta região, assim como no RS deve se relacionar com a variação das temperaturas ao longo do ano. Não se conhece a temperatura base para o desenvolvimento de *H. ethilla narcaea*, porém *Dione juno juno* (Cramer, 1779) outro heliconíneo que ocorre no RS tem limiar de desenvolvimento estimado de 5,3°C para ovo, 8,4°C para o estágio de lagarta e 9,0°C para estágio de pupa (Bianchi & Moreira, 2005).

Por isso, estima-se que temperaturas mais baixas, como as do inverno rigoroso do RS possam impedir o desenvolvimento de *H. ethilla narcaea*, no entanto, isso ainda não foi testado. Sabendo que esta espécie habita várias regiões do Rio Grande do Sul e

que algumas destas apresentam diferenças nas médias de temperatura durante a mesma estação, o presente trabalho investigou o metabolismo intermediário e o balanço oxidativo de lagartas de *H. ethilla narcaea* em relação à média de temperatura de ocorrência nos meses de primavera na região metropolitana de Porto Alegre e em São Francisco de Paula. Por serem os meses em que a população começa a se reestabelecer no ambiente, surgiu o interesse em investigar se existem diferenças nos parâmetros fisiológicos de indivíduos que ocorrem em locais diferentes do estado e a influência de pequenas mudanças climáticas locais.

Assim, caracterizamos parâmetros fisiológicos ligados à composição bioquímica destes animais (proteínas, ácido úrico, lactato, glicogênio, lipídios, triglicerídeos e colesterol), bem como os componentes do sistema antioxidante (superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase) e possíveis danos oxidativos, através da quantificação da lipoperoxidação, nas lagartas desta espécie. Ressalta-se ainda que nunca foram estudados estes parâmetros nas espécies de *Heliconius*, dessa forma, a abordagem feita aqui é totalmente original e relevante para o conhecimento, tanto da espécie, quanto do gênero.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas de *Heliconius ethilla narcaea* foram coletadas em São Francisco de Paula/RS (29°26'32"S 50°37'16"O), transportadas e mantidas a posteriori, em viveiros medindo cerca de 2x2x3m localizados em área adjacente ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. No interior dos viveiros manteve-se o cultivo de diversas plantas a fim de simular as condições naturais do ambiente, bem como *Passiflora edulis*, planta hospedeira de *H.e.narcaea*. As borboletas foram alimentadas diariamente através de

recipientes com mistura preparada com água, mel e pólen (Nardin *et al.*, 2014). O mel é fonte de glicídios e é necessário para reserva energética do indivíduo, e o pólen constitui fonte de proteínas e está diretamente ligado à fecundidade e longevidade dos indivíduos de *Heliconius* (Harpel *et al.*, 2015).

4.2.1 Testes de temperatura

Os ovos foram coletados diariamente e transferidos para potes contendo *Passiflora edulis*, *ad libitum* para a alimentação das lagartas quando da sua eclosão; as plantas eram renovadas todos os dias, bem como a limpeza dos recipientes.

Os potes de criação das lagartas, foram mantidos em duas temperaturas, 19 e 24°C em incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) e sala climatizada, respectivamente, ambas com o mesmo fotoperíodo (12h de luz: 12h de escuridão) e umidade relativa do ar próxima dos 60%. Estas temperaturas foram escolhidas, pois são as que mais se aproximam das médias apresentadas, após monitoramento nos meses da primavera nos anos de 2015 e 2016, em dois municípios de ocorrência de *H. ethilla narcaea*, em São Francisco de Paula com média de primavera de 19° C, e em Porto Alegre (30°04'13"S 51°07'10"O), cuja média de primavera é de 24° C (Tab. 1 do material suplementar). O desenvolvimento foi acompanhado e somente indivíduos saudáveis do 5° *instar* foram analisados. Nesse *instar* as lagartas foram pesadas, crioeutanasiadas e utilizadas para as análises de metabolismo intermediário e balanço oxidativo.

4.2.2 Análises do metabolismo intermediário

Os parâmetros metabólicos e do balanço oxidativo foram realizadas com lagartas de 5º *instar* de no máximo, 24h. Estas análises envolveram a avaliação dos níveis de proteínas, ácido úrico, lactato e glicogênio em quatro lagartas mantidas a 24°C e três a 19°C. Para avaliação dos lipídios, dos triglicerídeos e do colesterol foram utilizadas outras quatro lagartas para 24°C e três para 19°C. Sendo cada um dos parâmetros quantificados em quadruplicata para cada animal.

A extração do glicogênio seguiu o método de (Van Handel, 1965), sendo quantificado como glicose após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (Na₂CO₃) utilizando-se o kit da Labtest (glicose PAP Liquiform), segundo o método da glicose oxidase. As proteínas foram quantificadas segundo método descrito por (Beyer, 1983). O ácido úrico foi determinado através do Kit da Labtest (Ácido Úrico Liquiform); para a quantificação do lactado também foi usado Kit comercial da labtest. Os lipídios, triglicerídios e colesterol teciduais foram extraídos pelo método do clorofórmio e metanol na proporção 2:1, segundo o método de (Folch & Lees, 1957). A dosagem de lipídios totais se deu conforme o método descrito por (Frings & Dunn, 1970) e a do colesterol total conforme o kit da Labtest (Colesterol Total Liquiform). Os triglicerídeos tiveram dosagem determinada através do kit da Labtest (Triglicerídeos GPO-ANA). Todos os resultados foram expressos em mg/g.

4.2.3 Análises do balanço oxidativo

O balanço oxidativo foi analisado através das determinações de TBARS e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) em seis lagartas de 5º *instar* que foram mantidas a temperatura de 24°C e quatro lagartas mantidas a temperatura de 19°C. Todos os parâmetros foram quantificados em quadruplicata para cada animal.

O ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizado para a determinação da lipoperoxidação (LPO), sendo esta técnica utilizada para medir o nível de dano dos lipídios da membrana, já que o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos. A determinação segue modificações propostas por (Buege & Aust, 1978). A concentração de TBARS está expressa em $\mu\text{moles.mg de proteínas}^{-1}$. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo descrito por (Boveris *et al.*, 1983), expressa em unidade de mg por proteína por minuto. A decomposição do peróxido de hidrogênio é proporcional a atividade da catalase. Dessa forma, a atividade da enzima catalase foi medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio (Boveris & Chance, 1973). Os resultados estão expressos em $\text{pmoles. minuto}^{-1} \cdot \text{mg de proteínas}^{-1}$. A atividade da glutathione S-transferase foi medida pelo método de Boyland & Chasseaud (1969) e expressa em $\mu\text{moles. minuto}^{-1} \cdot \text{mg de proteínas}^{-1}$.

4.2.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados no programa SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA, 2008) e os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. Para analisar a massa corporal das lagartas utilizamos Teste t, dada a normalidade dos dados (de acordo com o teste de Shapiro-Wilk). Para a análise dos metabólitos ligados ao metabolismo intermediário, dado que estes apresentavam distribuição normal, utilizamos a análise de variância multivariada (MANOVA), em que a variação da temperatura (24 e 19°C) foi a variável independente, e cada um dos sete biomarcadores de metabolismo intermediário constituíram as variáveis dependentes. A análise do balanço oxidativo também foi feita por MANOVA, onde as enzimas e o dano oxidativo foram às variáveis dependentes. O teste de Bonferroni foi utilizado para os testes par a par, tanto em relação aos metabólitos, quanto ao balanço oxidativo.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Metabolismo intermediário

A Manova realizada entre os dois tratamentos e as sete variáveis dependentes foi significativa (λ Wilks= 0,001 $p= 0,042$ e potência observada de 0,771), indicando que existe diferença nos níveis dos biomarcadores em relação a temperatura em que o organismo foi mantido (Tab. 2 do material suplementar). Quando comparamos aos pares através do teste de Bonferroni, os níveis dos metabólitos energéticos, proteínas totais, ácido úrico, glicogênio, lipídios totais e triglicerídeos não diferiram entre as lagartas mantidas nas duas temperaturas (Fig. 1 e 2). No entanto, os níveis de lactato das lagartas mantidas a temperatura de 24°C foi menor do que das lagartas em 19°C ($p=0,000$); já para os níveis de colesterol observamos que estes foram maiores em lagartas mantidas a 24°C (Fig. 1 e 2). A massa corporal, nas lagartas mantidas na maior temperatura foi menor (Teste t $p= 0,042$) (Fig. 1).

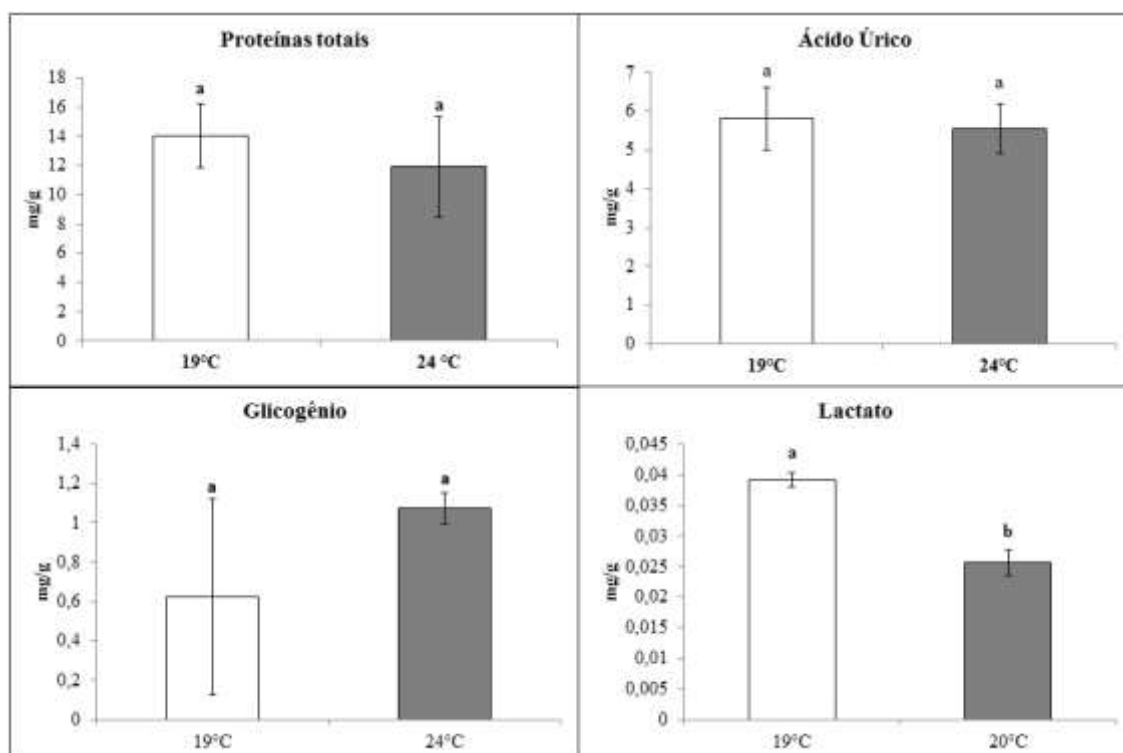


Fig. 1. Níveis de proteínas totais, ácido úrico, glicogênio e lactato em homogeneizado total de lagartas de *H. ethilla narcaea* do 5° instar mantidas a temperaturas de 24°C (barra cinza) e 19°C (barra branca). As barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os valores médios para um $p < 0,05$.

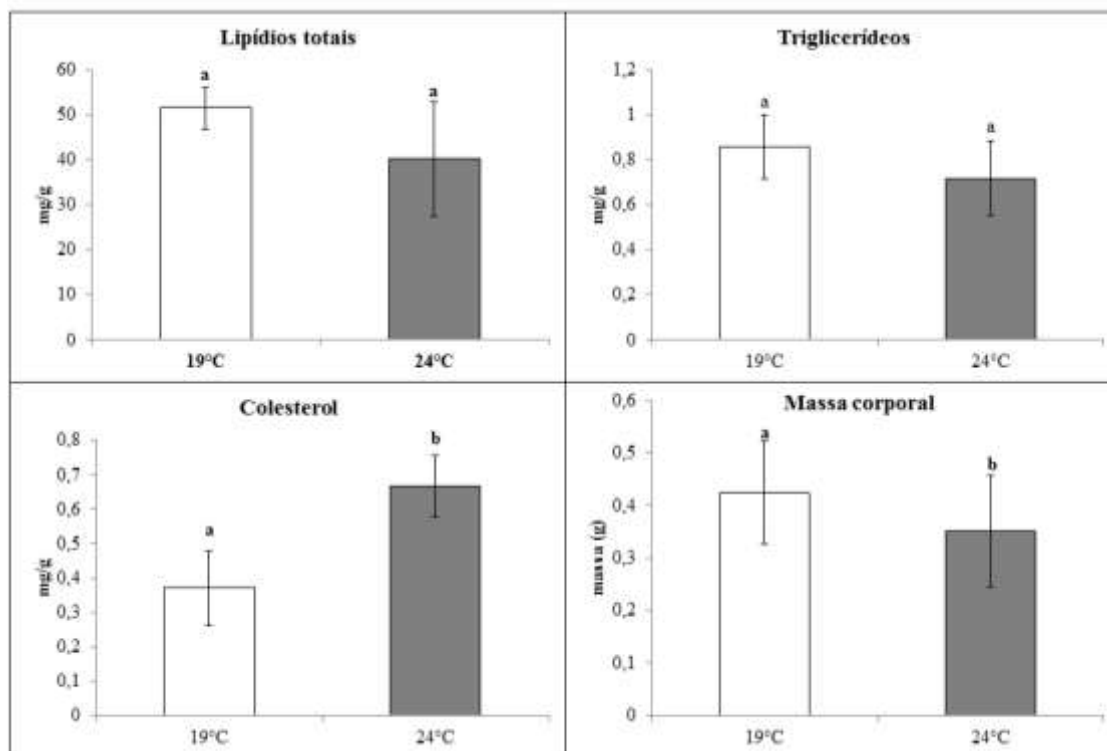


Fig. 2. Níveis de lipídios totais, triglicerídeos e colesterol em homeogeneizado total, e a massa corporal de lagartas de *H. ethilla narcaea* do 5° instar mantidas a temperaturas de 24°C (barra cinza) e 19°C (barra branca). Barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os valores médios.

4.3.2 Enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica

Dada a normalidade dos dados obtidos das análises dos biomarcadores do balanço oxidativo, realizamos a MANOVA, sobre a qual não obtivemos significância nos dados (λ Wilks= 0,525 $p= 0,437$ e potência observada de 0,175). Esse resultado indica que os marcadores do balanço oxidativo dos organismos testados não foram influenciados pelas temperaturas na qual foram mantidos. A comparação dos pares de

tratamento (19 e 24° C), para a atividade das enzimas antioxidantes e os níveis de lipoperoxidação também não apresentaram diferenças entre os grupos (Fig. 3).

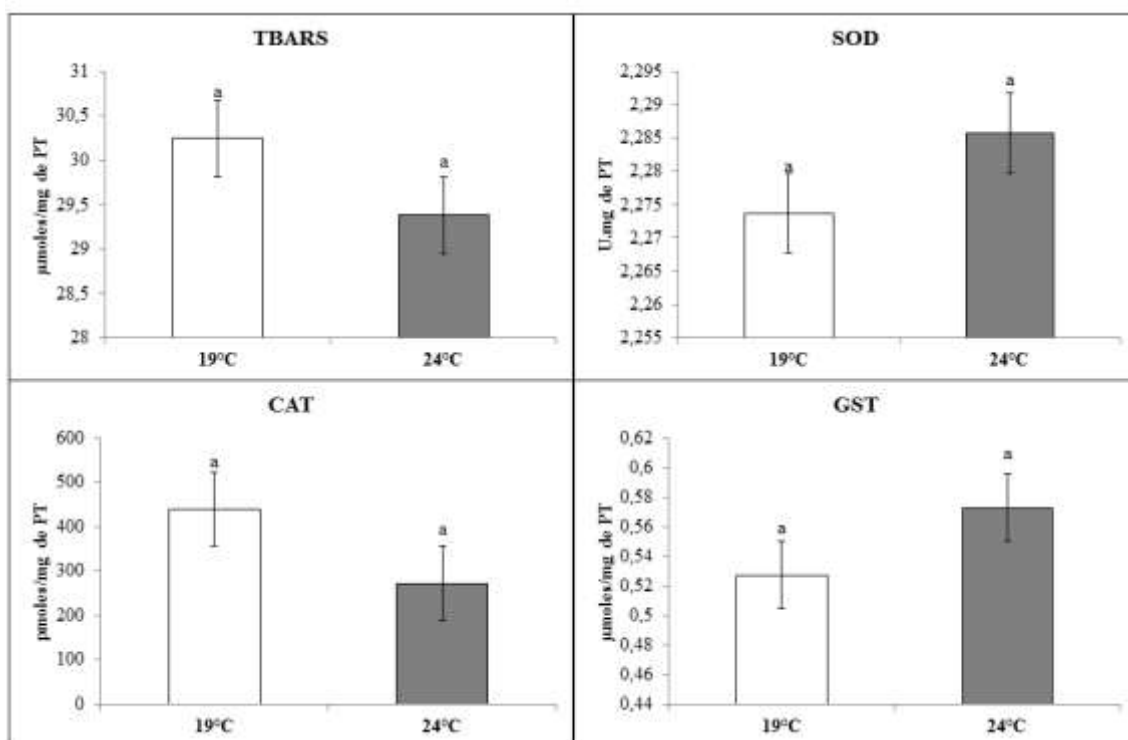


Fig. 3. Níveis de peroxidação lipídica (TBARS), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutaciona S-transferase (GST) de lagartas de *H. ethilla narcaea* do 5° instar mantidas a temperaturas de 24°C (barra cinza) e 19°C (barra branca). Barras representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os valores médios para um $p < 0,05$.

4.4 DISCUSSÃO

A maioria dos organismos ocupa ambientes térmicos variáveis, experimentando desafios importantes para os principais componentes da aptidão, como a sobrevivência e a reprodução (Karl *et al.*, 2012). A temperatura funciona então como um agente seletivo (Hoffmann & Hercus, 2000; Clarke, 2003) e o entendimento dos mecanismos através dos quais os organismos respondem a variação ambiental é importante. Pesquisas neste contexto têm recebido crescente atenção devido à rápida mudança climática induzida pela humanidade (Dahlhoff & Rank, 2007). As metodologias que permitem relacionar

as funções moleculares e fisiológicas cresceram nos últimos anos, no entanto, ainda existe uma quantidade muito baixa de trabalhos que analisam estes parâmetros em borboletas (Beaulieu *et al.*, 2015) e mais escassos ainda os que investigam a fisiologia das borboletas da América Neotropical (Moreira & Hermes-lima, 2012).

Determinamos os níveis de alguns marcadores do metabolismo intermediário (proteínas, ácido úrico, glicogênio, lactato, lipídios, triglicerídeos e colesterol) em lagartas de quinto *instar* mantidas desde o ovo em duas temperaturas diferentes (19 e 24°C). Por conta da quase ausência de trabalhos sobre o metabolismo intermediário em borboletas do gênero *Heliconius*, não dispomos de valores de referência desta fase do desenvolvimento em diferentes espécies para uma comparação. O único estudo desenvolvido com *Heliconius* foi feito por (Arisi, 2016) que analisou os mesmos parâmetros do metabolismo intermediário desde pupas até adultos, pós-cópula, em *Heliconius erato phyllis*. Nossos resultados diferem daqueles verificados por (Arisi, 2016) para pupas 24h, o que denota um padrão fase específico e possivelmente espécie-específico. O que talvez possa estar associado a algumas especificidades de distribuição geográfica e interações de habitat entre as espécies deste gênero (*Heliconius*), experimentos futuros devem ser performados para aprofundar tal hipótese.

Nossos resultados revelaram diferenças significativas nos níveis de lactato e colesterol entre as duas temperaturas testadas, associado à manutenção dos níveis dos demais marcadores do metabolismo intermediário. Cabe ressaltar que as borboletas são insetos holometábolos e como tais, durante os instares larvais a principal atividade destes animais é alimentar-se e acumular reservas energéticas para realizar a metamorfose, bem como para fornecer reservas para o adulto (Mirth & Riddiford, 2007). Esta característica pode justificar o padrão aqui encontrado para lagartas que foram mantidas desde o ovo até o quinto instar. Isto evidencia uma plasticidade de adaptação

na faixa de variação de temperatura testada e conduz o animal a maximizar o acúmulo de reservas endógenas a fim de garantir o sucesso no desenvolvimento. Estes resultados também reforçam a hipótese de que temperaturas mais baixas, como as do inverno rigoroso do RS possam impedir o desenvolvimento de *H. ethilla narcaea* e assim, restringir sua distribuição ou condicionar esta a ocorrência ocupação de microhabitats.

Embora relatado em poucos insetos, o lactato é o principal produto final do metabolismo anaeróbio. Os níveis de lactato registrados no nosso experimento foram maiores nas lagartas mantidas a temperatura de 19°C, o que nos permite sugerir que as lagartas mantenham uma atividade de forrageio mais elevada que aquelas expostas a 24°C e que este metabólito, esteja elevado em função de uma atividade digestória mais alta. (Miyagi *et al.*, 2013) descobriu que larvas do Coloptera *Gastrophysa atrocyanea* que alimentam-se de plantas ricas em oxalato, possuem um mecanismo único para acumular quantidades elevadas de lactato. No mesmo estudo os autores relatam que lagartas da borboleta *Papilio machaon* alimentada com erva-doce (*Foeniculum vulgare*) também, acumularam lactato. Não podemos descartar que o mesmo mecanismo seja o responsável pelo aumento dos níveis de lactato em *H. ethilla narcea* mantidas em 19°C já que *Passiflora edulis* também possui oxalato (Beraldo & Kato, 2010). Isto parece ser corroborado pelos maiores valores de massa corporal encontrados em lagartas também mantidas nesta temperatura (19 °C).

Dentro deste contexto, não podemos esquecer que a trealose é o mais importante açúcar presente na hemolinfa dos insetos, sendo esta um dissacarídeo não redutor sintetizado pela ação combinada de duas enzimas (trealose-6-fosfato sintase e a trealose-6-fosfato fosfatase) que catalisam a síntese de trealose no corpo gorduroso a partir de dois intermediários da glicólise, a glicose-1-fosfato e a glicose-6-fosfato. Ela serve como uma fonte energética circulante, tal como a glicose o faz no sangue dos

vertebrados. Além disto, este açúcar atua como componente estrutural e de transporte, serve para a proteção de membranas e proteínas contra efeitos adversos de estresse, tais como calor, frio, dessecação, anoxia e, em alguns casos, parece ser importante na eclosão de ovos (Pessoa *et al.*, 2017). Assim, os maiores níveis de lactato verificados nos animais mantidos a 19° C podem também, ser resultado do uso de trealose para a produção de energia para sustentar o padrão de atividade e o desenvolvimento dos animais nesta fase. Qualquer uma das estratégias descritas para explicar o incremento dos níveis de lactato seria vantajosa, pois os animais conseguiriam manter suas reservas de glicogênio. Além do glicogênio, tanto os triglicerídeos como as proteínas foram mantidos constantes independente da temperatura na qual as larvas foram cultivadas; o que novamente nos permite sugerir um papel chave para a trealose como substrato energético nesta fase do desenvolvimento.

O lactato, por exemplo, acumula-se no músculo da tíbia extensora de gafanhotos durante o salto (Harrison *et al.*, 1991). Desta forma, também é possível que as lagartas tenham acionado recursos energéticos para suprir essa atividade muscular. Assim sendo, a atividade muscular das lagartas de *H. ethilla narcaea* a 19°C provavelmente tenham utilizado a produção de lactato anaeróbico para a geração de ATP, assim como descrito para os músculos segmentais de larvas de coleópteros e também de Lepidoptera (Gäde, 1985). A produção do lactato anaeróbico se dá através da Lactato Desidrogenase (LDH), enzima glicolítica importante em quase todos os tecidos animais e que está envolvida na produção de energia (Kaplan & Pesce, 1996).

Sabendo que altas temperaturas aceleram o desenvolvimento e conseqüentemente os processos de ecdise, diminuindo os intervalos entre cada uma das ocorrências. O aumento do colesterol nos animais mantidos desde o ovo até o quinto *instar* em uma temperatura mais elevada talvez esteja associado a uma maior síntese do

hormônio ecdisona para garantir os processos de crescimento e um maior aporte de colesterol para sustentar as necessidades estruturais dos animais. Ao longo do cultivo experimental, nós observamos que os animais mantidos em temperatura mais baixa (19°C) iniciaram sua eclosão cerca de três dias após observarmos a primeira eclosão entre os ovos mantidos a 24 ° C, reforçando assim, nossa hipótese de desenvolvimento mais rápido para os animais mantidos em temperaturas mais elevadas (24° C).

Contudo, não podemos quantificar ou calcular a taxa de crescimento, pois os animais de cada grupo experimental foram mantidos de forma agrupada. Bavaresco *et al.* (2002) estudando as exigências térmicas da mariposa *Spodoptera cosmioides* relata que o desenvolvimento pode ser acelerado quando o animal se encontra próximo de sua temperatura ótima, apesar de poder viver em uma faixa mais ampla de variação de temperatura. Os estudos de Rawlins & Lederhouse (1981) e Zalucki (1982) mostraram que as larvas de monarcas não se desenvolvem a temperaturas abaixo de 10° C ou acima de 34° C. As monarcas geralmente desenvolvem-se mais rápido em temperaturas mais altas, como as que experimentam em ambiente natural (27° C), demorando aproximadamente 12 dias para passar por todos os cinco instares, e aquelas criadas em temperaturas cada vez mais baixas, levando mais tempo.

Estudos com larvas de *Drosophila melanogaster* mostraram que a presença de um gene mutante que dificultava a absorção de colesterol adquirido através da dieta resultou na morte das larvas durante os instares iniciais do desenvolvimento (Voght *et al.*, 2007). Da mesma forma, a redução na concentração de colesterol na hemolinfa do noctuídeo *Spodoptera litura* causou um atraso no desenvolvimento das lagartas até a formação da pupa (Guo *et al.*, 2009). Esses resultados indicam que o colesterol tem um papel importante no processo de desenvolvimento dos insetos imaturos até adultos, seja como precursor hormonal ou como uma molécula estrutural. O processo de

desenvolvimento é essencialmente regido pelo hormônio ecdisona (20-hidroxiecdisona ou 20-HE) (Schwedes & Carney, 2012) e as sinalizações para o controle da muda são bem conhecidas em diferentes insetos (*D. melanogaster*, *A. aegypti*, *Manduca sexta*, *Blattella germânica* e *Tribolium Casteneum*) (Majerowicz & Gondim, 2014).

A temperatura também influencia na qualidade do alimento e nas taxas de consumo em insetos herbívoros. A análise sobre os pesos das lagartas mostram que os indivíduos mantidos em temperaturas mais baixas apresentaram maior massa corporal do que as mantidas em temperaturas maiores. De fato, durante o experimento, as lagartas não tinham risco de predação, como teriam na natureza e a alimentação foi oferecida *ad libitum*. Os dados obtidos se relacionam positivamente aos registrados por (Stamp, 1990), quando registrou menos biomassa em lagartas de *Manduca sexta* criadas em temperaturas mais quentes. Muitos estudos já relataram que em temperaturas mais quentes, geralmente as taxas de crescimento são maiores do que em temperaturas mais baixas, ou amenas (Reynolds & Nottingham, 1985), o que (Levesque *et al.*, 2002) corrobora com seus dados, através das análises com lagartas de *Malacosoma disstria* de 4° instar em três temperaturas (18, 24 e 30°C). Além disso, já foi também registrado que quanto maior a taxa de crescimento, menor é o tempo gasto no instar (Stamp, 1990; Levesque *et al.*, 2002; Zipkin *et al.*, 2012). No entanto, a relação entre as taxas de crescimento, tempo no instar e massa corporal é regulada por processo neuroendócrino que define primeiramente um peso crítico para a realização do início da muda ou ecdise e posteriormente o tempo de crescimento para a obtenção do peso crítico (Levesque *et al.*, 2002). Além de aumentar as taxas de crescimento e diminuir a massa corporal das lagartas, as temperaturas mais altas também reduzem a massa pupal (Lemoine *et al.*, 2015).

Apesar da diferença de temperatura em que os animais foram cultivados (19 e 24° C), eles conseguem manter o sistema antioxidante sem variações significativas na atividade das enzimas estudadas (SOD, CAT e GST), o que se reflete na ausência de variação nos níveis de lipoperoxidação. Não podemos descartar que outras enzimas antioxidantes não quantificadas, como a glutathione peroxidase e a glutathione reductase, e/ou as defesas antioxidantes não enzimáticas estejam intermediando esta resposta. Outra possibilidade é que esteja ocorrendo dano oxidativo sobre as proteínas e/ou outros componentes celulares. Contudo, ressaltamos a ausência de mortalidade ao longo do experimento.

O aumento da temperatura afeta todos os organismos vivos, estimulando todos os processos metabólicos de acordo com os princípios termodinâmicos conhecidos (Lushchak, 2011). Contudo, os animais podem ser capazes de corrigir possíveis desequilíbrios como a produção de ERO, regulando positivamente suas defesas antioxidantes endógenas e/ou podem responder com mudanças comportamentais.

O ajuste comportamental mais descrito pela bibliografia é de que animais expostos a condições de calor evitam o uso fisiológico das defesas antioxidantes buscando um habitat mais favorável em relação à temperatura. No entanto, para que isso possa ocorrer o ambiente precisa fornecer refúgios, como áreas sombreadas e tocas. Isso se torna bastante problemático em locais onde a variabilidade térmica é baixa (Huey *et al.*, 2012). Sendo adverso também, para os indivíduos imaturos, como as lagartas, que dispõem de locomoção limitada. No presente estudo, não foi ofertada a possibilidade de refúgios para as lagartas, impedindo que estas busquem um ambiente mais favorável, o que nos permite sugerir que estes animais diminuam sua atividade metabólica na temperatura mais elevada de cultivo (24° C) a fim de evitarem uma situação de estresse oxidativo. Outros autores também propuseram uma redução da atividade física

diminuindo assim a produção de ERO, já que a busca por melhores condições deve aumentar ainda mais a taxa metabólica (Gannon *et al.*, 2014; Beaulieu *et al.*, 2015). Este padrão também reflete uma plasticidade fisiológica dos indivíduos de *Heliconius ethila narcea* que habita diferentes lugares com diferentes climas e consegue manter suas populações por longos períodos do ano. Da mesma forma Beaulieu *et al.* (2015) mostrou em lagartas de *Bicyclus anynana*, mantidas a 25°C e 33°C, que o dano oxidativo (TBARS) não aumentou com o aumento da temperatura; sugerindo que além da redução da atividade nesta faixa de temperatura a espécie não apresenta danos moleculares, como já documentado também em moscas domésticas (Sohal *et al.*, 1993).

As plantas de Passiflora são bem protegidas quimicamente, tendo sido descrita a presença de flavonoides, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, assim como a presença de taninos e saponinas (Castro *et al.*, 2018). Visto que muitas destas moléculas são pró-oxidantes pode-se sugerir uma capacidade antioxidante e/ou do sistema de biotransformação mais eficiente nestes animais. Contudo, os mesmos autores relatam que as heliconiinas podem sintetizar os próprios glicosídeos cianogênicos, apresentando capacidade de lidar com esses compostos, o que foi provavelmente uma das adaptações mais cruciais que permitiram ao ancestral destas borboletas se alimentarem de Passiflora. De fato, já foi demonstrado que as larvas de *Heliconius* podem sequestrar glicosídeos cianogênicos e alcalóides de suas plantas hospedeiras e utilizá-los para seu próprio benefício. Além disto, Rudnicki *et al.* (2007) demonstraram que extratos foliares de *P. alata* e *P. edulis* possuem potentes propriedades antioxidantes *in vitro* e *ex vivo* de mamíferos, e podem ser considerados como possíveis novas fontes de antioxidantes naturais, sendo a atividade antioxidante diretamente correlacionada com o elevado teor de polifenóis presentes nestes extratos. Assim, outra possibilidade que pode explicar nossos resultados de balanço oxidativo, seria o aumento da ingestão e/ou

absorção e/ou acúmulo de moléculas antioxidantes obtidas das folhas de *Passiflora edulis* pelas lagartas de *H. ethila narcea*, a fim de obterem não só nutrientes, mas principalmente moléculas antioxidantes. Beaulieu *et al.* (2015) observaram que borboletas adultas de *Bicyclus anynana* mantidas a 25°C e 33°C quase dobraram a ingestão de polifenóis nas condições mais quentes, além de reduzirem a atividade de voo. Curiosamente, estas borboletas aumentaram a ingestão de polifenóis pela manhã, quando também consumiram recursos energéticos (açúcar). O aumento da ingestão de polifenóis nas manhãs quentes levou à diminuição da ingestão de açúcar no meio do dia, o que pode ter contribuído para reduzir a atividade de voo naquele momento. No geral, isso sugere que *B. anynana* priorizou a ingestão de polifenol sobre a ingestão de energia (e seus benefícios associados) sob condições quentes. Em nosso estudo não oferecemos outro recurso alimentar as larvas que não fossem folhas de *Passiflora edulis*. Da mesma forma que o verificado em nosso estudo com *H. ethila narcea* a temperatura não afetou as defesas antioxidantes endógenas (medidas pela atividade da superóxido dismutase) e não aumentou o dano oxidativo em *Bicyclus anynana* (Beaulieu *et al.*, 2015). Zalucki (1982) e York & Oberhauser (2002) afirmam que ovos e lagartas de borboletas monarca são mais resistentes a altas temperaturas do que as pupas. As características encontradas para a resposta do balanço oxidativo, incluindo a atividade da GST nos permite sugerir um possível traço de processo co-evolutivo entre a planta (*Passiflora edulis*) e seu hospedeiro (*H.e.narcea*) que merece ser investigado no futuro como já sugerido por (Castro *et al.*, 2018) para outros aspectos desta interação.

Estes resultados sugerem que as borboletas respondem às condições quentes ajustando possivelmente seu comportamento, sua atividade metabólica e priorizando, através da ingestão e acúmulo de moléculas antioxidantes que podem ser oriundas do alimento ofertado (*Passiflora edulis*). Mantendo assim, suas reservas energéticas

(glicogênio, triglicerídeos e proteínas), além de evitarem um desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes através do incremento do sistema antioxidante não enzimático. Isto reflete a plasticidade fisiológica dos indivíduos da espécie que habitam diferentes lugares com diferentes climas e conseguem manter suas populações por longos períodos do ano.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Gianfranco Ceni pelo auxílio no trabalho de campo. Ao PPG de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por disponibilizar o espaço para o cultivo dos indivíduos adultos e das lagartas. À bióloga Gabriela Miranda pelo auxílio na manutenção das lagartas. À Mestre Etiele Senna por ceder algumas imagens que fazem parte do Resumo gráfico. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de doutorado no PPG de Ecologia e Evolução da Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa a BDC e a bolsa de produtividade a GTO 936 (n°307071/2015-4).

REFERÊNCIAS

- Ahmad, S. (1995) *Oxidative Stress and antioxidant defenses in biology*. Springer, New York.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C. *et al.* (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, **22**, 711-728.
- Andrade, R.B. & Freitas, A.V. (2005) Population biology of two species of *Heliconius* (Nymphalidae : Heliconiinae) in a semi-deciduous forest in Southeastern Brazil. *Journal of the Lepidopterists' Society*, **59**, 223-228.

- Arisi, T.A. (2016) *Conflito sexual: por que machos e fêmeas de Heliconius erato phyllis apresentam assincronia no início da reprodução?* Unpublished Dissertation in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Arrese, E.L. & Soulages, J.L. (2010) Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual review of entomology*, **55**, 207-225.
- Athenstaedt, K. & Daum, G. (2006) The life cycle of neutral lipids: Synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**, 1355-1369.
- Bavaresco, A., Garcia, M.S., Grtzmacher, A.D. *et al.* (2002) Biologia e exigências térmicas de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, **31**, 49-54.
- Beaulieu, M., Gillen, E., Hahn, S. *et al.* (2015) Behavioural antioxidant strategies to cope with high temperatures: A study in a tropical butterfly. *Animal Behaviour*, **109**, 89-99.
- Beraldo, J. & Kato, E.T.M. (2010) Morfoanatomia de folhas e caules de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20**, 233-239.
- Berryman, A.A. (1996) What causes population cycles of forest Lepidoptera? *Tree*, **11**, 28-31.
- Beyer, R.E. (1983) A rapid biuret assay for protein of whole fatty tissues. *Analytical biochemistry*, **129**, 483-485.
- Bianchi, V. & Moreira, G.R.P. (2005) Preferência alimentar, efeito da planta hospedeira e da densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno juno* (Cramer) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **22**, 43-50.
- Boveris, A. & Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, **134**, 707-716.
- Boveris, A., Fraga, C.G., Varsavsky, A.I. *et al.* (1983) Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **227**, 534-541.
- Boyland, E. & Chasseaud, L.F. (1969) The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, **32**, 173-219.

- Buege, J.A. & Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, **52**, 302-310.
- Castro, É.C.P., Zagrobelny, M., Cardoso, M.Z. *et al.* (2018) The arms race between heliconiine butterflies and *Passiflora* plants – new insights on an ancient subject. *Biological Reviews*, **93**, 555-573.
- Clarke, A. (2003) Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 573-581.
- Dahlhoff, E.P. & Rank, N.R. (2007) The role of stress proteins in responses of a montane willow leaf beetle to environmental temperature variation. *Journal of biosciences*, **32**, 477-488.
- Dean, R.L., Collins, J.V. & Locke, M. (1985) Structure of the fat body. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (ed by G.A. Kerkut and L.I. Gilbert), pp. 155-210. Pergamon Press, Oxford.
- Ehrlich, P.R. & Gilbert, L.E. (1973) Population structure and dynamics of the tropical butterfly *Heliconius ethilla*. *Biotropica*, **5**, 69-82.
- Folch, J. & Lees, M. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, **226**, 497-509.
- Frings, C. & Dunn, R. (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology*, **53**, 89-91.
- Gäde, G. (1985) Anaerobic energy metabolism. *Environmental Physiology and Biochemistry of Insects* (ed by K.H. Hoffmann), pp. 119-136. SpringerVerlag, Berlin.
- Gannon, R., Taylor, M.D., Suthers, I.M. *et al.* (2014) Thermal limitation of performance and biogeography in a free-ranging ectotherm : insights from accelerometry. *The Journal of experimental biology*, **217**, 3033-3037.
- Guo, X.-r., Zheng, S.-c., Liu, L. *et al.* (2009) The sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase (SCPx) is involved in cholesterol uptake in the midgut of *Spodoptera litura*: gene cloning, expression, localization and functional analyses. *BMC Molecular Biology*, **18**, 1-18.
- Harpel, D., Cullen, D.A., Ott, S.R. *et al.* (2015) Pollen feeding proteomics: salivary proteins of the passion flower butterfly, *Heliconius melpomene*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **63**, 7-13.

- Harrison, J.F., Phillips, J.E. & Gleeson, T.T. (1991) Activity physiology of the two-striped grasshopper, *Melanoplus bivittatus*: gas exchange, hemolymph acid-base status, lactate production, and the effect of temperature. *Physiological Zoology*, **64**, 451-472.
- Hermes-Lima, M. (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: regulation and adaptation* (ed by K.B. Storey), pp. 319-368. Wiley, New York.
- Hoffmann, A.A. & Hercus, M.J. (2000) Environmental stress as an evolutionary force. *BioScience*, **50**, 217-226.
- Holzinger, H. & Holzinger, R. (1994) *Heliconius and related genera*. Sciences Nat., Venette.
- Huey, R.B., Kearney, M.R., Krockenberger, A. *et al.* (2012) Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philosophical transactions of the Royal Society*, **367**, 1665-1679.
- Jia, A.F.-x., Dou, W., Hu, F. *et al.* (2011) Effects of thermal stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, **94**, 956-963.
- Jones, D.P. (2006) Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, **8**, 1-16.
- Kaplan, L.A. & Pesce, A.J. (1996) *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. Mosby-Year Book Inc., St. Louis.
- Karl, I., Michalowsky, C., Srensen, J.G. *et al.* (2012) Effects of rearing and induction temperature on the temporal dynamics of heat shock protein 70 expression in a butterfly. *Physiological Entomology*, **37**, 103-108.
- Köppen, G.W. (1936) Das geographische system der klimate. *Handbuch der klimatologie* (ed by W. Köppen and R. Geiger), pp. 1-44. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- Lemoine, N.P., Capdevielle, J.N. & Parker, J.D. (2015) Effects of *in situ* climate warming on monarch caterpillar (*Danaus plexippus*) development. *PeerJ*, **1293**, 1-10.
- Levesque, K.R., Fortin, M. & Mauffette, Y. (2002) Temperature and food quality effects on growth, consumption and post-ingestive utilization efficiencies of the forest tent caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Bulletin of Entomological Research*, **92**, 127-136.

- Lockey, K.H. (1988) Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **89**, 595-645.
- Lushchak, V.I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, **101**, 13-30.
- Majerowicz, D. & Gondim, K.C. (2014) Insect lipid metabolism: insights into gene expression regulation. *Recent Trends in Gene Expression* (ed by S.S. Mandal), pp. 147-190. Nova Science Publishers.
- Mirth, C.K. & Riddiford, L.M. (2007) Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *BioEssays*, **29**, 344-355.
- Miyagi, A., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, M. *et al.* (2013) Metabolome analysis of food-chain between plants and insects. *Metabolomics*, **9**, 1254-1261.
- Moreira, D.C. & Hermes-lima, M. (2012) Redox metabolism during tropical diapause in a Lepidoptera larva. *Living in a seasonal world* (ed by T. Ruf, C. Bieber, W. Arnold and E. Millesi), pp. 399-409. Springer, Berlin.
- Nardin, J.D., Missaggia, B.O. & Araújo, A.M. (2014) An experimental approach to test the source of information on kinship in butterfly immatures. *Ethology, Ecology and Evolution*, **27**, 294-305.
- Perc-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdakovi, M. *et al.* (2018) Chemosphere parameters of oxidative stress, cholinesterase activity, Cd bioaccumulation in the brain and midgut of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) caterpillars from unpolluted and polluted forests. *Chemosphere*, **218**, 416-424.
- Pessoa, M.C.F., Izumi, É., Zanotto, S.P. *et al.* (2017) Kinetic characterization and molecular modeling of trehalose-6-phosphate phosphatase from *Anopheles gambiae* and expressed in *Pichia pastoris*. *African Journal of Biotechnology*, **16**, 1366-1378.
- Ramos, R.R. & Freitas, A.V. (1999) Population biology, wing color variation and ecological plasticity in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society*, **53**, 11-21.
- Ramzi, S., Seraji, A., Gonbad, R.A. *et al.* (2018) Effects of *Artemisia annua* methanolic extract on the enzymatic components of intermediary metabolism and the antioxidant system of *Pseudococcus viburni* Signoret. *Journal of Plant Protection Research*, **58**, 289-296.

- Rawlins, J.E. & Lederhouse, R.C. (1981) Developmental influences of thermal behavior on monarch caterpillars (*Danaus plexippus*): an adaptation for migration (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, **54**, 387-408.
- Reynolds, S.E. & Nottingham, S.F. (1985) Effects of temperature on growth and efficiency of food utilization in fifth-instar caterpillars of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, **31**, 129-134.
- Ribeiro, M.C., Martensen, A.C., Metzger, J.P. *et al.* (2011) The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. *Biodiversity Hotspots* (ed by F. Zachos and J. Habel), pp. 405-434. Springer, Berlin.
- Rudnicki, M., Oliveira, M.R., Pereira, T.V. *et al.* (2007) Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*, **100**, 719-724.
- Schwedes, C.C. & Carney, G.E. (2012) Ecdysone signaling in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 293-302.
- Sobral-Souza, T., Francini, R.B., Guimares, M. *et al.* (2015) Short-term dynamics reveals seasonality in a Subtropical *Heliconius* butterfly. *Journal of Insects*, **2015**, 1-5.
- Sohal, R.S., Agarwal, S., Dubey, A. *et al.* (1993) Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Biochemistry*, **90**, 7255-7259.
- Stamp, N.E. (1990) Growth *versus* molting time of caterpillars as a function of temperature, nutrient concentration and the phenolic rutin. *International Association for Ecology Growth*, **82**, 107-113.
- Storey, K.B. (1997) Organic solutes in freezing tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **117**, 319-326.
- Van Handel, E. (1965) Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical biochemistry*, **11**, 256-265.
- Voght, S.P., Fluegel, M.L., Andrews, L.A. *et al.* (2007) *Drosophila* NPC1b promotes an early step in sterol absorption from the midgut epithelium. *Cell Metabolism*, **5**, 195-205.
- Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N. *et al.* (2002) Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *Journal of Experimental Biology*, **205**, 2799-2802.

- York, H.A. & Oberhauser, K.S. (2002) Effects of duration and timing of heat stress on monarch butterfly (*Danaus plexippus*) (Lepidoptera: Nymphalidae) development *Journal of the Kansas Entomological Society*, **75**, 290-298.
- Zalucki, P. (1982) Temperature and rate of development in *Danaus plexippus* and *D. chrysippus* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of the Australian Entomological Society*, **21**, 241-246.
- Zipkin, E.F., Ries, L., Reeves, R. *et al.* (2012) Tracking climate impacts on the migratory monarch butterfly. *Global Change Biology*, **18**, 3039-3049.

Tab. 1. Médias de temperaturas máximas e mínimas em São Francisco de Paula e Porto Alegre (RS), desde a primavera de 2015 ao verão de 2017. As médias e desvio padrão foram calculados sobre as temperaturas dos meses que compõem a estação.

ANO	MÊS	São Francisco de Paula		Porto Alegre	
		Temp.máx °C	Temp.min °C	Temp.máx °C	Temp.min °C
Primavera 2015	SET	17,6	10,3	21,5	13,7
	OUT	18,1	11,1	23,2	15,1
	NOV	19,9	13,2	24,9	17,1
	DEZ	23,2	15,9	29	20,3
	média	19,7	12,6	24,6	16,5
	desv.padrão	2,19	2,16	2,78	2,47
Verão 2016	JAN	24,6	17,2	31,1	20,5
	FEV	25,2	18	31,4	21,1
	MAR	21,6	15,4	26,9	18,6
	média	23,8	16,8	29,8	20
	desv.padrão	1,57	1,08	2,05	1,06
Inverno 2016	ABR	22,7	15,7	27,1	19,1
	MAI	14,4	9	19	11,4
	JUN	13	6,1	16,3	7,7
	JUL	16	8,4	18	10,9
	AGO	17,2	9,9	20,9	11,9
	média	16,66	9,82	20,26	12,2
	desv.padrão	3,33	3,19	3,73	3,74
Primavera 2016	SET	17,6	8,8	20,2	11,4
	OUT	19,5	11,3	23,7	15,2
	NOV	21,4	12	26,2	15,8
	DEZ	23,8	15,4	29,7	19,7
	média	20,5	11,8	24,9	15,5
	desv.padrão	2,29	2,35	3,47	2,94
Verão 2017	JAN	26	18	30,5	21,4
	FEV	27	18	31,2	22,2
	MAR	27	18	28,1	19,3
	média	26,6	18	29,9	20,9
	desv.padrão	0,47	0	1,32	1,22

Tab 2. Análises estatísticas do balanço metabólico e oxidativo realizado nas lagartas lagartas de *H. ethilla narcaea* do 5º instar mantidas a temperaturas de 19°C e 24°C. *significância estatística de $p < 0,05$.

Biomarcador	Temperatura	<i>n</i>	Shapiro Wilk	Levene	Manova λ Wilks	<i>p</i>	Bonferroni																																																																																																									
Proteínas totais	19°C	3	0,465	0,359	0,001	0,002*	0,366																																																																																																									
	24°C	4	0,188					Ácido úrico	19°C	3	0,736	0,839			0,665	24°C	4	0,853	Glicogênio	19°C	3	0,157	0,119			0,193	24°C	4	0,099	Lactato	19°C	3	0,298	0,181			0*	24°C	4	0,524	Lipídios totais	19°C	3	0,967	0,222	0,061	0,025*	0,155	24°C	4	0,872	Colesterol	19°C	3	0,63	0,49			0,012*	24°C	4	0,987	Triglicerídeos	19°C	3	0,207	0,815			0,285	24°C	4	0,755	TBARS	19°C	4	0,524	0,222	0,525	0,437	0,55	24°C	6	0,298	GST	19°C	4	0,99	0,191			0,846	24°C	6	0,004	SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928	24°C	6	0,542	CAT	19°C	4	0,053	0,054	
Ácido úrico	19°C	3	0,736	0,839			0,665																																																																																																									
	24°C	4	0,853					Glicogênio	19°C	3	0,157	0,119			0,193	24°C	4	0,099	Lactato	19°C	3	0,298	0,181			0*	24°C	4	0,524	Lipídios totais	19°C	3	0,967	0,222	0,061	0,025*	0,155	24°C	4	0,872	Colesterol	19°C	3	0,63	0,49			0,012*	24°C	4	0,987	Triglicerídeos	19°C	3	0,207	0,815			0,285	24°C	4	0,755	TBARS	19°C	4	0,524	0,222	0,525	0,437	0,55	24°C	6	0,298	GST	19°C	4	0,99	0,191			0,846	24°C	6	0,004	SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928	24°C	6	0,542	CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193	24°C	6	0,03						
Glicogênio	19°C	3	0,157	0,119			0,193																																																																																																									
	24°C	4	0,099					Lactato	19°C	3	0,298	0,181			0*	24°C	4	0,524	Lipídios totais	19°C	3	0,967	0,222	0,061	0,025*	0,155	24°C	4	0,872	Colesterol	19°C	3	0,63	0,49			0,012*	24°C	4	0,987	Triglicerídeos	19°C	3	0,207	0,815			0,285	24°C	4	0,755	TBARS	19°C	4	0,524	0,222	0,525	0,437	0,55	24°C	6	0,298	GST	19°C	4	0,99	0,191			0,846	24°C	6	0,004	SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928	24°C	6	0,542	CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193	24°C	6	0,03																	
Lactato	19°C	3	0,298	0,181			0*																																																																																																									
	24°C	4	0,524					Lipídios totais	19°C	3	0,967	0,222	0,061	0,025*	0,155	24°C	4	0,872	Colesterol	19°C	3	0,63	0,49			0,012*	24°C	4	0,987	Triglicerídeos	19°C	3	0,207	0,815			0,285	24°C	4	0,755	TBARS	19°C	4	0,524	0,222	0,525	0,437	0,55	24°C	6	0,298	GST	19°C	4	0,99	0,191			0,846	24°C	6	0,004	SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928	24°C	6	0,542	CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193	24°C	6	0,03																												
Lipídios totais	19°C	3	0,967	0,222	0,061	0,025*	0,155																																																																																																									
	24°C	4	0,872					Colesterol	19°C	3	0,63	0,49			0,012*	24°C	4	0,987	Triglicerídeos	19°C	3	0,207	0,815			0,285	24°C	4	0,755	TBARS	19°C	4	0,524	0,222	0,525	0,437	0,55	24°C	6	0,298	GST	19°C	4	0,99	0,191			0,846	24°C	6	0,004	SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928	24°C	6	0,542	CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193	24°C	6	0,03																																							
Colesterol	19°C	3	0,63	0,49			0,012*																																																																																																									
	24°C	4	0,987					Triglicerídeos	19°C	3	0,207	0,815			0,285	24°C	4	0,755	TBARS	19°C	4	0,524	0,222	0,525	0,437	0,55	24°C	6	0,298	GST	19°C	4	0,99	0,191			0,846	24°C	6	0,004	SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928	24°C	6	0,542	CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193	24°C	6	0,03																																																		
Triglicerídeos	19°C	3	0,207	0,815			0,285																																																																																																									
	24°C	4	0,755					TBARS	19°C	4	0,524	0,222	0,525	0,437	0,55	24°C	6	0,298	GST	19°C	4	0,99	0,191			0,846	24°C	6	0,004	SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928	24°C	6	0,542	CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193	24°C	6	0,03																																																													
TBARS	19°C	4	0,524	0,222	0,525	0,437	0,55																																																																																																									
	24°C	6	0,298					GST	19°C	4	0,99	0,191			0,846	24°C	6	0,004	SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928	24°C	6	0,542	CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193	24°C	6	0,03																																																																								
GST	19°C	4	0,99	0,191			0,846																																																																																																									
	24°C	6	0,004					SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928	24°C	6	0,542	CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193	24°C	6	0,03																																																																																			
SOD	19°C	4	0,869	0,525			0,928																																																																																																									
	24°C	6	0,542					CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193	24°C	6	0,03																																																																																														
CAT	19°C	4	0,053	0,054			0,193																																																																																																									
	24°C	6	0,03																																																																																																													

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta Tese buscou compreender alguns aspectos fisiológicos e morfológicos de borboletas *Heliconius* no sul do Brasil que possam estar relacionados à relação mimética e a distribuição de algumas espécies do sul do Brasil. Para isso utilizamos três espécies, *H. besckei* e *H. erato phyllis*, pertencentes à clados distintos e que formam par mimético, e *H. ethilla narcaea* do mesmo clado de *H. besckei*. Todas podem ser simpátricas nas regiões em que ocorre *H. besckei*, acima de 700m de altitude.

Inexistem estudos sobre a Fisiologia, características de voo e dispersão de *H. besckei*. Nós investigamos se esta espécie convergiu padrões fisiológicos e morfológicos em relação à sua espécie mimética *H. erato phyllis*. Nossos resultados mostraram que além do padrão de coloração das asas, as duas espécies, embora distantes filogeneticamente (*H. besckei* pertence ao clado silvaniforme e *H. e. phyllis* ao clado de acasalamento pupal), compartilham outras características. Estas características como a forma e o tamanho das asas e a massa corporal (tórax e abdômen), além de alguns marcadores do balanço oxidativo (TBARS, SOD e GST) e do metabolismo energético (proteínas totais, lipídios totais, triglicerídeos, colesterol e glicogênio) são convergentes entre as espécies miméticas. A semelhança dessas características reforça o padrão do par mimético e distancia *H. besckei* de *H. ethilla narcaea* em relação a estes parâmetros.

Nos ambientes em que as três espécies são simpátricas, o fenótipo de coloração das asas com mancha vermelha é reforçado pela ocorrência das duas espécies (*H. besckei* e *H. e. phyllis*). Os predadores evitam esse padrão de coloração por conta da aprendizagem sobre a impalatabilidade destas borboletas. Além disso, como mostramos nos nossos resultados outras características podem ser cooptadas para reforçar o padrão

de aviso. O tipo de voo flapping, por exemplo, que ambas miméticas apresentam e que difere do voo plano de *H. ethilla narcaea*, reforça nossos resultados para a composição bioquímica dos animais, já que o voo *flapping* exige o maior gasto energético dentre os voos das borboletas.

Contudo, a peculiaridade de *H. besckei* em relação às outras duas espécies, relacionada à ocorrência exclusiva, em áreas de maiores altitudes e mais baixas temperaturas, pode fazer com que alguns dos outros parâmetros que avaliamos tenham diferenças. A área mitocondrial maior nesta espécie pode estar indiretamente ligada a menor atividade da catalase e de níveis mais baixos de lactato.

Os resultados obtidos no capítulo 1 corroboram com os obtidos no capítulo 2 para a avaliação do voo das três espécies. Seguramente outros fatores são importantes para manter o mimetismo. No entanto, ainda não se conhece a história de vida de *H. besckei* e por isso não é possível afirmar que outras características além destas testadas não sejam semelhantes em relação à *H. ethilla narcaea*. Os resultados obtidos através de animais coletados diretamente do ambiente podem apresentar alguma variação, no entanto, mesmo assim foi possível identificar diferenças entre as espécies. Estudos futuros podem envolver criação de animais em laboratório e avaliar todo o desenvolvimento como forma de identificar diferenças ou semelhanças pontuais em determinados momentos do desenvolvimento. Além disso, podemos sugerir também avaliar a dispersão e o *home range* de *H. besckei* e de *H. ethilla narcaea* para complementar as avaliações fisiológicas e morfológicas sobre o voo que realizamos aqui.

Nós tínhamos também o objetivo de investigar os parâmetros fisiológicos em relação à temperatura de ocorrência das espécies. No entanto, devido a diversas intempéries, realizamos somente com a espécie *H. ethilla narcaea*. Esses resultados nos

mostraram que existe uma influencia da temperatura sobre os parâmetros fisiológicos estudados para a espécie. As lagartas que mantivemos em 19°C apresentaram uma maior massa corporal em comparação com as lagartas mantidas a 24°C. Isto demonstra, possivelmente, uma modulação da atividade metabólica, do forrageio e/ou do aproveitamento dos nutrientes advindos da dieta (*Passiflora edulis*), o que levou a um incremento dos níveis de lactato nas lagartas mantidas em mais baixas temperaturas e a uma possível ausência de estresse oxidativo (medida pelos níveis de TBARS) aliada a níveis mais elevados de colesterol nas lagartas mantidas na mais alta temperatura. Sugere-se que em estudos futuros, sejam realizados experimentos frente à temperatura com uma faixa mais ampla de variação desta variável, além de outras espécies de *Heliconius*, como forma de avaliar a plasticidade dos indivíduos em relação ao ambiente em ocorrem e as variações climáticas a que são submetidos.

Nossos resultados para avaliação das consequências fisiológicas do canibalismo em *H. erato phyllis* mostraram que os níveis de metabólitos e de marcadores do balanço oxidativo se mantêm sem influência, tanto em lagartas quanto em pupas. Sabe-se que o desenvolvimento de lagartas de Lepidoptera é bastante dispendioso em termos de energia. No entanto, a ingesta de nutriente diferente da herbivoria ocorre somente no primeiro *instar*, por ingestão do ovo. As lagartas de 1° *instar* que foram canibais passaram mais rapidamente para o 2° *instar* e conseqüentemente se estivessem em ambiente natural teriam vantagem sobre o forrageamento da planta hospedeira. Em estudos futuros sugere-se que sejam realizadas análises sobre os primeiros instares larvais quanto aos parâmetros estudados. Nosso estudo é pioneiro em avaliações nesse âmbito com o gênero *Heliconius*, dessa forma a originalidade desses resultados auxiliará na compreensão de inúmeros fatores sobre o grupo que ainda não foram elucidados, bem como de outros que surgirão.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br